

Die Bedeutung des Zelladhäsionsmoleküls CEACAM1 für den Verlauf einer bakteriell-induzierten Kolitis

**Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades**

Dr. rer. nat.

**der Fakultät
für Biologie**

**an der
Universität Duisburg-Essen**

**vorgelegt von
Julia Zöller**

**aus Dortmund
August 2017**

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. A. M. Westendorf
2. Gutachter: Prof. Dr. K. S. Lang

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: PD Dr. B. Giebel

Tag der Disputation: 13.12.2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	X
1 Einleitung.....	1
1.1 Regulation der intestinalen Homöostase.....	1
1.1.1 Die mukosale Darmbarriere: Bestandteile, Funktion	1
1.1.1.1 <i>Dysregulation der intestinalen Permeabilität über</i> <i>immunologische und bakterielle Stimuli</i>	6
1.1.2 Das intestinale Immunsystem: Ein Überblick	7
1.1.2.1 <i>Das angeborene mukosale Immunsystem</i>	8
1.1.2.2 <i>Das adaptive mukosale Immunsystem</i>	10
1.1.2.3 <i>Co-inhibitorische Toleranzmechanismen</i>	12
1.2 Zelladhäsionsmoleküle-CEA	15
1.2.1 CEACAM1	16
1.3 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	18
1.3.1 Ätiologie und Pathogenese	19
1.3.1.1 <i>Umweltfaktoren</i>	20
1.3.1.2 <i>Intestinales Mikrobiom/Barriere</i>	21
1.3.1.3 <i>Genetische Faktoren</i>	22
1.3.1.4 <i>Immunsystem</i>	23
1.4 Mausmodelle zur Analyse von Erkrankungen des	
gastrointestinalen Traktes	24
1.4.1 <i>Citrobacter rodentium</i> : Ein physiologisches Modell	
bakteriell-induzierter Kolitis	26
2 Zielsetzung	30
3 Material und Methoden.....	31
3.1 Chemikalien und Lösungen.....	31
3.2 Verbrauchsmaterialien	32
3.3 Puffer	33
3.4 Zellkulturmedien.....	34

3.5 Kommerzielle Kits und Reagenzien	35
3.6 Primer	35
3.7 Antikörper und Fluorochrome.....	36
3.8 Geräte	38
3.9 Bakterien.....	39
3.10 Mausstämme	39
3.10.1 Ceacam1 ^{-/-} oder auch 2D2	39
3.10.2 C57Bl/6J	39
3.11 Zellbiologische Methoden	39
3.11.1 Allgemeine Kulturbedingungen von	
Einzelzellsuspensionen.....	39
3.11.1.1 <i>Isolierung von Splenozyten</i>	40
3.11.1.2 <i>Zellisolierung aus den mesenterialen Lymphknoten</i>	40
3.11.1.3 <i>Isolierung von Lamina propria Lymphozyten</i>	40
3.11.2 Isolierung von CD8 ⁺ T-Zellen mittels magnetischer	
Zellsortierung (MACS).....	41
3.11.3 Durchflusszytometrie.....	42
3.11.3.1 <i>Oberflächenfärbung von Proteinen</i>	42
3.11.3.2 <i>Intrazelluläre Färbung von Proteinen</i>	43
3.11.3.3 <i>Intrazelluläre Färbung von IL17A und IFNγ</i>	43
3.11.4 CFSE Markierung von CD8 ⁺ T-Zellen	44
3.11.5 <i>In vitro</i> Analyse der PD-1 Expression und Proliferation	
von CD8 ⁺ T-Zellen	44
3.11.6 Bestimmung von Zellzahlen	45
3.11.7 Kultivierung von Kolon-Biopsien	45
3.11.8 Quantifizierung sezernierter Zytokine.....	45
3.12 Molekularbiologische Methoden	46
3.12.1 Kultivierung von <i>Citrobacter rodentium</i> aus	
der Stammhaltung.....	46
3.12.2 RNA- Isolierung.....	46
3.12.3 Spektrophotometrische Quantifizierung von	
Ribonukleinsäuren	46
3.12.4 cDNA Erststrangsynthese	47

3.12.5	Semi-quantitative RPS9-PCR	48
3.12.6	Agarosegel-Elektrophorese.....	49
3.12.7	Quantitative <i>Real-Time</i> PCR.....	49
3.13	Tierexperimentelle Methoden	50
3.13.1	Induktion einer bakteriellen Kolitis mit	
	<i>Citrobacter rodentium</i>	50
3.13.2	Depletion von CD8 ⁺ T-Lymphozyten.....	52
3.13.3	Generierung von Knochenmark-Chimären.....	53
3.13.4	Membranpermeabilitätsassay	54
3.14	Histologische Untersuchungen	56
3.14.1	Histopathologische Untersuchung des Kolons.....	56
3.14.2	Immunohistochemische Färbung von Kolon-Präparaten	56
3.15	Software und Statistik	57
4	Ergebnisse	58
4.1	Einfluss von CEACAM1 auf eine bakteriell-induzierte Kolitis	58
4.1.1	Analyse der CEACAM1 Expression im Kolon	58
4.2	Auswirkungen einer CEACAM1-Defizienz auf die <i>C. rodentium</i>	
	induzierte Colitis.....	61
4.3	Ist das hämatopoetische oder nicht-hämatopoetische Kompartiment	
	die treibende Kraft der Pathologie?.....	67
4.4	Regulation der intestinalen Permeabilität durch CEACAM1.....	69
4.5	Bedeutung von CEACAM1 für Effektor-T-Zell-vermittelte	
	Immunreaktionen	73
4.5.1	CEACAM1 und CD4 ⁺ Effektor-T-Zellen.....	73
4.5.2	CEACAM1 und CD8 ⁺ Effektor-T-Zellen.....	75
4.6	Analyse von <i>Ceacam1</i> ^{-/-} CD8 ⁺ T-Lymphozyten <i>in vitro</i>	78
4.7	Depletion von CD8 ⁺ T-Lymphozyten in <i>Ceacam1</i> ^{-/-} -Mäusen	
	führt zu einer reduzierten Pathologie nach Infektion mit	
	<i>Citrobacter rodentium</i>	81
5	Diskussion	84
5.1	CEACAM1 und die Regulation der intestinalen Permeabilität.....	85
5.2	CEACAM1 und das adaptive Immunsystem	90

6 Zusammenfassung	96
6 Summary	98
7 Literaturverzeichnis	100
8 Danksagung	132
9 Lebenslauf	134
10 Erklärungen	136

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Biochemische und immunregulatorische Barrieren des Gastrointestinaltraktes..	3
Abbildung 1-2: Organisation des intestinalen Epithels.....	4
Abbildung 1-3: Das intestinale Immunsystem unter Homöostase.....	8
Abbildung 1-4: CD4 ⁺ T-Zell-Populationen und ihre Differenzierungsfaktoren.....	12
Abbildung 1-5: Co-Inhibitorische Moleküle und Interaktionen zur Regulation der T-Zellfunktion.....	14
Abbildung 1-6: Die humane CEA-Immunglobulin Superfamilie.....	16
Abbildung 1-7: CEACAM1-Isoformen.	18
Abbildung 1-8: CED als multifaktorielle Erkrankung.	20
Abbildung 1-9: <i>C. rodentium</i> induzierte TMCH.	27
Abbildung 3-1: Schematischer Aufbau der Versuchsdurchführung einer <i>C. rodentium</i> induzierten Kolitis.	52
Abbildung 3-2: Schema der Depletion von CD8 ⁺ T-Zellen.....	53
Abbildung 3-3: Versuchsprinzip zur Quantifizierung der intestinalen Permeabilität.....	55
Abbildung 4-1: Lokalisation der CEACAM1 Expression im Kolon von naiven WT-Mäusen.	59
Abbildung 4-2: Auswirkungen einer bakteriellen Infektion auf die CEACAM1-Expression und Lokalisation der Bakterien im intestinalen Epithel.....	60
Abbildung 4-3: Auswirkungen einer CEACAM1-Defizienz auf die Kolonisierung des intestinalen Epithels mit <i>C. rodentium</i>	62
Abbildung 4-4: Charakterisierung der makroskopischen Parameter von <i>Ceacam1</i> ^{-/-} -Tieren im Vergleich zum WT.....	63
Abbildung 4-5: Einfluss von CEACAM1 auf die histopathologischen Parameter.	64
Abbildung 4-6: Serum-Zytokinprofil von <i>Ceacam1</i> ^{-/-} -Tieren.....	66
Abbildung 4-7: Generierung von Knochenmark-Chimären..	68
Abbildung 4-8: Bestimmung der intestinalen Permeabilität.....	70

Abbildung 4-9: Expression von Zell-Zell Kontakt vermittelnden Proteinkomplexen und antimikrobieller Proteine	
im intestinalen Epithel.....	72
Abbildung 4-10: Das CD4 ⁺ Effektor-T-Zell-Kompartiment in <i>Ceacam1^{-/-}</i> - Mäusen.....	74
Abbildung 4-11: Das CD8 ⁺ Effektor-T-Zell-Kompartiment in <i>Ceacam1^{-/-}</i> - Mäusen.....	76
Abbildung 4-12: Expression inhibitorischer Moleküle von CD8 ⁺ T-Zellen..	78
Abbildung 4-13: <i>In vitro</i> Analyse von <i>Ceacam1^{-/-}</i> CD8 ⁺ T-Zellen.	79
Abbildung 4-14: <i>In vitro</i> Zytokinprofil von stimulierten <i>Ceacam1^{-/-}</i>	
CD8 ⁺ T-Zellen.....	80
Abbildung 4-15: Einfluss von CD8 ⁺ T-Zellen in <i>Ceacam1^{-/-}</i> -Tieren	
während einer bakteriellen Infektion.	81
Abbildung 4-16: Einfluss von CD8 ⁺ T-Zellen in <i>Ceacam1^{-/-}</i> -Tieren auf die Pathologie während einer bakteriell induzierten Kolitis.....	82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Auswahl an Mausmodellen zur biologischen Untersuchung von CED	25
Tabelle 3-1: Verwendete Chemikalien und Lösungen.....	31
Tabelle 3-2: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	32
Tabelle 3-3: Verwendete Kits und Reagenzien.....	35
Tabelle 3-4: Verwendete .Primer	35
Tabelle 3-5: Verwendete Fluorochrome.....	36
Tabelle 3-6: Verwendete Antikörper.	37
Tabelle 3-7: Verwendete Geräte.....	38
Tabelle 3-8: Programm der Semi-quantitative PCR.....	49
Tabelle 3-9: Real-Time PCR Programm	50

Abkürzungsverzeichnis

AICD	engl. <i>adherent-invasive E. coli</i>
AJ	Adherens junctions
AJK	apikalen junctionalen Komplex
AMPs	antimikrobielle Peptide
AP-1	aktivierendes Protein 1
APC	Antigen-präsentierende Zellen
BAT	HLA-B assoziiertes Transkript 3
Bcl-XL	engl. <i>B- cell lymphoma-extra large</i>
BTLA	B- und T-Lymphozyt-assoziiertes Protein
bzw.	beziehungsweise
C. rodentium	<i>Citrobacter rodentium</i>
ca.	circa
CC1 ^{-/-}	<i>Ceacam1^{-/-}</i> ; genetische Deletion von CEACAM1
CCR7	C-C-Motiv-Chemokin-Rezeptor 7
CD	engl. <i>Cluster of differentiation</i>
CEACAM1	Carzinoembryonales Antigen-ähnliches Zelladhäsionsmolekül 1
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
Cox-43	Connexin-43
CR	<i>Citrobacter rodentium</i>
CTLA-4	zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole
DC	Dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Dexoxyribonuclease
dNTP	Deoxy-Nukleotid-Triphosphate
dpi.	engl. <i>days post-infection</i>
DSS	Dextran-Natrium-Sulfat
E-Cadherin	<i>Epithelial-Cadherin</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EGTA	Ethylenglycol-bis-(aminoethylether)-tetraessigsäure
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
engl.	Englisch
EOMES	Eomesodermin
EPEC	enteropathogenes <i>Escherichia coli</i>
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FCS	Fötales Kälberserum
Fitc-Dextran beads	engl. <i>Fluorescein isothiocyanate-dextran beads</i>
FoxP3	engl. <i>forkhead-box 3</i>
g	Gramm
GALT	Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe
GATA 3	GATA Binding Protein 3
GI	Gastrointestinaltrakt
GRB2	engl. <i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
GrzB	Granzym B
h	human
H&E	Hämatoxilin und Eosin Färbung
i.p.	intraperitoneal
IEZ	intestinalen Epithelzellen
IFN- γ	Interferon- γ
IgA	Immunoglobulin A
IgC2-Domäne	engl. <i>immunoglobulin constant-region-type-2- domain</i>
IgV	engl. <i>immunoglobulin variabel-region</i>
IL	Interleukin
ILF	isolierten Lymphfollikeln
iNOS	induzierbarer Stickstoffmonoxid-Synthasen
ITAM	engl. <i>immunereceptor tyrosin-based activating motif</i>
ITIM	engl. <i>immunereceptor tyrosin-based inhibitory motif</i>
iT _{regs}	induzierte regulatorische T-Zelle
ITSM	engl. <i>immunoreceptor tyrosine-based switch motif</i>
IVC	individuell belüftete Käfige

JAM	engl. <i>junctional adherens molecules</i>
Kap.	Kapitel
Kb	Kilobase
KM	Knochenmark
KU	Kolitis Ulcerosa
KO	Knock-Out
LAG-3	aktivierendes Lymphozyten Gen 3
LP	Lamina Propria
LPL	Lamina Propria Lymphozyten
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar
m	murin
MACS	magnetische Zellseparation
MC	Morbus Chron
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHCII	Haupthistokompatibilitätskomplex II
MLC	engl. <i>Mysin-light-chains</i>
MLCK	engl. <i>Myosin-light-chain-kinase</i>
mLN	mesenteriale Lymphknoten
MP	Mononukleäre Phagozyten
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i>
MUC	Muzin-Glykoproteinen
MyD88	engl. <i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
M-Zellen	Mikrofalten-Zellen
NFAT	engl. <i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NfκB	engl. <i>nuclear-factor-κB</i>
NK	Natürliche-Killerzellen
NLR	NOD-ähnliche Rezeptore
nm	Nanometer
NOD	engl. <i>nucleotide binding oligomerization domain</i>
nT _{reg}	natürliche regulatorische T-Zelle

PAMP	pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS	physiologische Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	Programmierender Todesrezeptor 1
PD1L	PD-1 Ligand
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
pIgR	polymere Immunglobulin-Rezeptoren
PLC γ	Phospholipase γ
PP	Peyer'schen Platten
PRR	Mustererkennungsrezeptoren
PSG	engl. <i>pregnancy-specific glycoproteins</i>
RA	Retinsäure
RegIII α	engl. <i>major regenerative III α protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktiver Sauerstoffspezies
RT	engl. <i>real-time</i>
s.i.	Dünndarm
Tbet	T-box Transkriptionsfaktor TBX21
T _{eff}	Effektor-T-Zellen
TGF- β	engl. <i>Transforming growth factor β</i>
T _h	T-Helferzellen
TIGIT	T-Zell Immunrezeptor mit ITIM und Immunglobulin Domänen
TIM-3	T-Zell Immunoglobulin 3
TJ	Tight Junctions
TLR	Toll-ähnlichen Rezeptoren
TMCH	engl. <i>transmissible murine crypt hyperplasia</i>
TNBS	Trinitrobenzonsulfonsäure
TNF- α	Tumor-Nekrose Faktor- α
T _r 1	regulatorische T-Zellen vom Typ 1

T _{reg}	regulatorische T-Zelle
TZR	T-Zell Rezeptor
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZO-1-3	Zona Occludens 1-3
ZTL oder Tc1	zytotoxische T-Zellen

1 Einleitung

1.1 Regulation der intestinalen Homöostase

1.1.1 Die mukosale Darmbarriere: Bestandteile, Funktion

Denkt man an biologische Barrieren, assoziiert man diesen Begriff vermutlich als erstes mit dem Hautepithel, das den gesamten menschlichen Körper bedeckt. Daneben gibt es zahlreiche andere Bereiche die nicht visuell erkennbar sind, aber dennoch unsere inneren Hohlräume auskleiden und vor potenziellen Gefahren externer und auch interner Natur schützen. Dazu zählen zum Beispiel die Schleimhäute (Mukosae) der Lungen, des Mundes, des Urogenital- oder auch Gastrointestinaltraktes (GI). Von all diesen stellt der gastrointestinale Trakt mit einer Oberfläche von 400m^2 das größte mukosale Gewebe im menschlichen Organismus dar (Peterson und Artis 2014). Auf Grund seiner Funktionen, die in der Resorption von Nährstoffen und dem gleichzeitigen Schutz vor potenziell schädlichen Komponenten liegen, spielen v.a. dort regulative Mechanismen eine entscheidende Rolle für die Gesundheit des menschlichen Organismus.

Die erste, auch als extrinsische oder Schleimhautbarriere bezeichnet, wird vom intestinalen Lumen selber und der das intestinale Epithel bedeckenden Muzin-Schicht gebildet. Während sich im Lumen des Dünndarms eine vergleichsweise geringe Menge an Mikroorganismen (hauptsächlich anaerobe Bakterien) befindet, beherbergt das Kolon mit 10^{14} Bakterien von 10^3 unterschiedlichen Stämmen den Großteil des intestinalen Mikrobioms (Atarashi und Honda 2011). Der Vorteil dieser dichten Besiedlung, die nahezu jede ökologische Nische besetzt, liegt zum einen in der Verdrängung von pathogenen Bakterien, über die Konkurrenz um die vorhandenen Nahrungsmittelressourcen, zum anderen in einer besseren Nährstoffversorgung, da das kommensale Mikrobiom zur Verdauung und Resorption von Nahrungsmittelbestandteilen (z.B.: Vitamin K₁ Synthese, Verdau von Cellulose) beiträgt (Macpherson et al. 2005). Die Muzin-Schicht, die das intestinale Epithel bedeckt, ist eine gelartige Flüssigkeit. Sie wird von spezialisierten Epithelzellen, sogenannten Goblet- oder auch Becherzellen, sezerniert und dient als biochemische Barriere zum Schutz des intestinalen Epithels vor dem direkten Kontakt mit Bakterien. Im Kolon sind innerhalb der Muzin-Schicht zwei Phasen voneinander zu unterscheiden, eine dichte innere und eine lockere äußere Schicht (Johansson et al. 2008). Die äußere Schicht, in der sich unter homöostatischen Bedingungen die

kommensalen Bakterien befinden, ist daher maßgeblich an der Bildung des intestinalen Mikrobioms beteiligt, wohingegen die dichte innere Schicht den direkten Kontakt mit dem darunterliegenden Epithel reguliert (Johansson et al. 2011). Neben diversen Mucin-Glykoproteinen (vor allem MUC2) sind antimikrobielle Peptide (AMPs), sowie sekretiertes Immunglobulin A (IgA) in der inneren Mucin-Schicht gelöst (**Abb. 1-1**) (Macpherson et al. 2009). Die Mucin-Barriere und deren Bestandteile spielen eine wichtige Rolle bei dem Erhalt der intestinalen Homöostase. So weisen Mäuse mit einer Deletion des MUC2-Gens eine wesentlich dünnere innere Mucin-Schicht auf, wodurch ein direkter Kontakt mit der Mikrobiota resultiert. Dadurch werden vermutlich entzündliche Prozesse, wie das Auftreten einer spontanen Kolitis, aber auch eine erhöhte Suszeptibilität von Kolonkarzinomen begünstigt. (Johansson et al. 2008; Velcich et al. 2002). Auch Kolitis Ulcerosa Patienten weisen eine deutlich dünnere Mucin-Schicht auf (Gersemann et al. 2012).

Zu bekannten AMP Produkten, sekretiert von Paneth-Zellen des Dünndarms, zählen Phospholipase A, α -Defensine (auch Cryptdine genannt) und C-Typ Lektine (z.B. RegIII α) und Cathelicidine. Ferner sezernieren Entero- bzw. Kolonozyten, die den Großteil an intestinalen Epithelzellen (IEZ) im Dün- oder Dickdarm ausmachen, β -Defensine (Gallo und Hooper 2012; Bevins und Salzman 2011). Studien im Mausmodell (MyD88^{-/-}) belegen durch eine reduzierte Expression von α -Defensinen und polymeren Immunglobulin-Rezeptoren (pIgR) sowie veränderter Komposition der Mikroflora eine Funktion von Defensinen an der Regulation des intestinalen Mikrobioms und Homöostase der intestinalen Barriere (Larsson et al. 2012). Auch im humanen System zeigten Patienten mit Morbus Chron manifestiert im Ileum reduzierte α -Defensin-Niveaus (Wehkamp et al. 2005b). Die Sekretion von IgA resultiert aus der Stimulation von B-Zellen in den Peyer'schen Platten (PP) durch Dendritische Zellen (DCs). In Anwesenheit von TGF- β (engl. *transforming growth factor* β) erfolgt ein Klassenwechsel der B-Zellen in IgA produzierende Plasmazellen (Niess et al. 2005; Macpherson und Uhr 2004). Das sezernierte IgA gelangt dann über den Prozess der Transzytose zum intestinalen Lumen und kann seine Schutzfunktion übernehmen (Rojas und Apodaca 2002). Die Wechselwirkung zwischen IEZ und IgA-sezernierenden B-Zellen zeigt dabei eine adaptive Komponente des intestinalen Epithels zur Regulation der intestinalen Mikroflora.

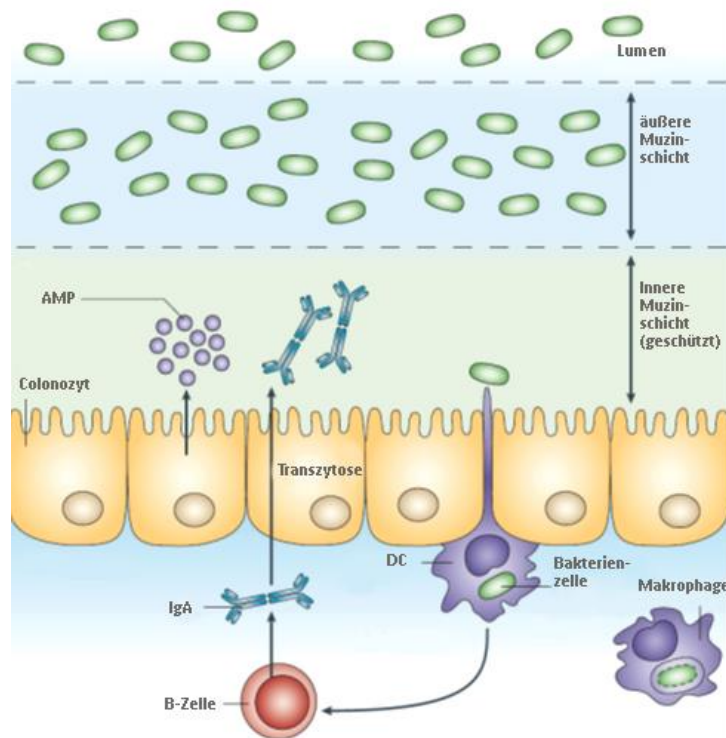


Abbildung 1-1: Biochemische und immunregulatorische Barrieren des Gastrointestinaltraktes. Abgebildet ist die physikalische und biochemische Barriere des Kolons. Der Monolayer geformt aus spezialisierten Epithelzellen (Kolonozyten, M-Zellen und Goblet-Zellen) bildet die mechanische Barriere des intestinalen Epithels. Ihre sekretierten Muzin-Glykoproteine, anti-mikrobiellen Proteine und von Plasmazellen sezerniertes Immunglobulin A (sIgA) sind in einer zweiphasigen Muzin-Schicht gelöst und dienen der Abwehr von pathogenen Antigenen aber auch als lösliche Verankerung und Lebensraum der kommensalen Mikroflora. Verändert nach (Hooper 2009).

Die IEZs, angeordnet in einem Monolayer, formen die intrinsische bzw. physikalische Barriere, um kommensale und pathogene Mikroorganismen vom Wirtsorganismus zu separieren (Blikslager et al. 2007; Podolsky 1999). Neben der Funktion als Barriere, gewährleistet das intestinale hochprismatische Epithel den selektiven Stofftransport von Nährstoffen, Wasser und Elektrolyten über den transzellulären und parazellulären Transportweg (Tsukita et al. 2001). Der transzelluläre Transportweg, durch die Epithelzellen hindurch in die extrazelluläre Flüssigkeit, ist ein aktiver Prozess. Dabei gelangen die unterschiedlichen Moleküle mit Hilfe spezifischer Transportproteine, die sich in der apikalen und basolateralen Seite des intestinalen Epithels befinden, in die extrazelluläre Flüssigkeit (Kunzelmann und Mall 2002). Der Transport größerer Partikel oder aber ganzer Bakterien und Mikropartikel, erfolgt entweder über aktive Endozytose oder spezialisierte IEZs, sogenannte Mikrofalten-Zellen (M-Zellen) (Kraehenbuhl und Neutra 2000). Im Gegensatz dazu dient der parazelluläre Transportweg als Passage für kleine hydrophile Moleküle, wie zum Beispiel Aminosäuren und Monosacchariden (Balda 1996). Der Transport zwischen zwei benachbarten Epithelzellen hindurch aus dem Darmlumen in das extrazelluläre Zirkulationssystem wird dabei von Haft- oder auch Schlussleistenkomplexen

(engl. *junctional complexes*) reguliert (**Abb.1-2, A**). Insgesamt werden 4 solcher Zellverbindungen unterschieden, nämlich die Tight junctions, Adherens junctions, Gap junctions und Desmosomen (Farquhar 1963).

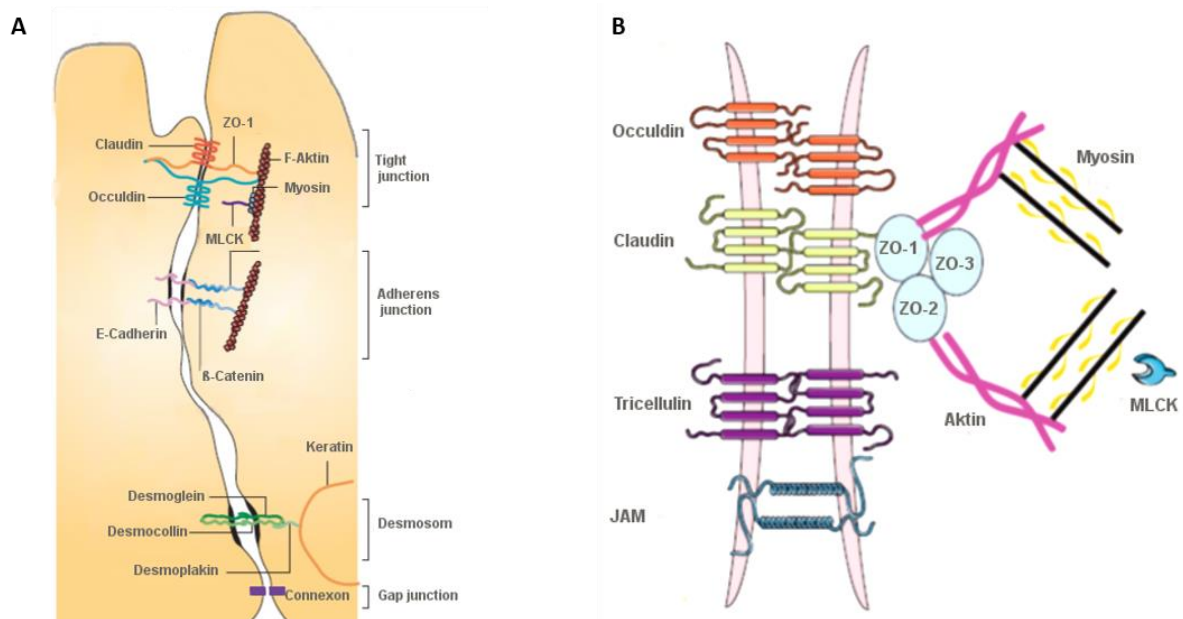


Abbildung 1-2: Organisation des intestinalen Epithels. A) Darstellung von intestinalen Zell-Zell Adhäsionskontakten im intestinalen Epithel. Der Zusammenhalt zwischen einzelnen Epithelzellen und letztlich die intestinale Permeabilität werden vor allem durch die undurchlässigen Zellverbindungen der Tight junctions sowie der darunterliegenden Adherens junctions reguliert. Aber auch Desmosomen (ebenfalls Adhäsionsverbindungen) und Gap junctions können im intestinalen Epithel gefunden werden (Turner 2009). **B)** Vereinfachte Darstellung der Tight junction Struktur. Die Multiproteinkomplexe werden aus einer komplexen Interaktion zwischen Occludin, Claudinen und Zona Occludens Proteinen (ZO) sowie Junctional adherens molecules (JAMs) und Tricellulin gebildet. Über die gemeinsame Interaktion mit den Aktin-Mysion-Komplexen wird die Lokalisation und Permeabilität des intestinalen Epithels reguliert. Verändert nach (Barreau und Hugot 2014).

Tight Junctions (TJs) zählen zu den undurchlässigen Zell-Zellverbindungen, die den parazellulären Transport regulieren und die Membranpolarität aufrechterhalten. Sie sind ein Multiproteinkomplex, geformt aus der Interaktion von Transmembranproteinen, peripheren Membranproteinen und regulatorischen Molekülen. Über die Interaktion mit Aktin- und Myosinfilamenten werden sie mit dem Cytoskelett der intestinalen Epithelzellen verbunden (Groschwitz und Hogan 2009). Den Hauptanteil der Transmembranproteine bilden Claudine. In Wirbeltieren konnten bisher 26 Mitglieder der Claudin-Proteinfamilie entdeckt werden, die ein variierendes, heterologes Expressionsprofil in den verschiedenen Epithelien aufweisen (Mineta et al. 2011; Garcia-Hernandez et al. 2017). Über die Ausbildung eines transmembranen und transzellulären Netzes sind sie maßgeblich an dem Erhalt der Membranpolarität und parazellulären Permeabilität von TJs beteiligt (Chiba et al. 2008). Die unterschiedlichen Claudine interagieren dabei entweder homo- oder heterophil miteinander (Furuse et al. 1999). Generell sind an der Bildung von TJs je zwei

Claudinproteine beteiligt (**Abb. 1-2**) (Tsukita et al. 2001; Rahner et al. 2001). Neben Claudin ist Occludin ebenfalls ein bekanntes Transmembranprotein von TJs, dessen genaue Funktion derzeit jedoch unklar ist (Groschwitz und Hogan 2009). Eine weitere integrale Membranproteinfamilie, die „*junctional adherens molecules*“ (JAMs), werden von einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen, wie Epithel-, Endothel- und Immunzellen exprimiert und gehören der Superfamilie der Immunglobuline an (Ebnet et al. 2004). Bekannt ist, dass eine homophile Interaktion z.B. zwischen JAM-A oder JAM-B an dem Erhalt funktionaler TJs beteiligt ist, wohingegen heterophile Interaktionen eine Rolle bei der Kommunikation zwischen Leukozyten und dem Endothel spielen können (Bazzoni et al. 2000; Bazzoni 2003). Zu den bekannten peripheren Membranproteinen zählen Zona Occludens 1-3 (ZO-1-3). Über die Interaktion mit den Transmembranproteinen und den Bestandteilen des Cytoskeletts, sorgen diese Proteine für eine feste und stabile Verankerung der TJ-Multiproteinkomplexe im intestinalen Epithel (Assimakopoulos et al. 2011).

Zusammen mit TJs formen die unmittelbar darunterliegenden Adherens junctions (AJs) und Desmosomen den sogenannten apikalen junctionalen Komplex (AJK) (Mehta et al. 2015). Dieser Zusammenschluss sorgt letztlich für den korrekten parazellulären Transport im intestinalen Epithel. Im Einzelnen sorgen AJs für eine konstante zelluläre Lokalisation im intestinalen Epithel, aber auch für eine interzelluläre horizontale Kommunikation zwischen den intestinalen Epithelzellen (Han und Yap 2012). Hauptbestandteil von AJs sind Cadherine, wovon *Epithelial*-Cadherin (auch E-Cadherin oder Cadherin-1) zu den bekanntesten zählt. Durch die homophile Interaktion seiner extrazellulären Domänen werden symmetrische Ankerverbindungen zwischen den benachbarten Epithelzellen erzeugt (Halbleib und Nelson 2006). Intrazellulär erfolgt über die Interaktion von E-Cadherin mit β -Catenin die lokale Regulation der Aktinzusammensetzung und damit die Bildung des perijunctionalen Aktomysion-Ringes, der die Verbindung zum Zytoskelett der intestinalen Epithelzellen darstellt (Han und Yap 2012). Fehlen AJs im intestinalen Epithel, resultiert dies in einem Verlust des Zell-Zell und Zell-Matrix Kontaktes, ineffektiver Zellpolarität, Differenzierung und Apoptose (Hermiston und Gordon 1995a).

1.1.1.1 Dysregulation der intestinalen Permeabilität über immunologische und bakterielle Stimuli

Die intestinale Permeabilität kann über unterschiedlichste Mechanismen reguliert werden, wobei vor allem exogene Faktoren wie zum Beispiel pathogene Mikroorganismen, apoptotische Prozesse der IEZs, das lokale Zytokin-Milieu sowie Immunzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems eine zentrale Rolle spielen (Groschwitz und Hogan 2009). Im Falle einer Dysregulation ist meistens die Integrität des intestinalen Epithels über die Aktivierung des zentralen MLCK abhängigen (engl. *Myosin-light-chain-kinase*) Regulationsmechanismus von TJs betroffen. Des Weiteren zeigen aktuelle Studien eine erhöhte Expression und Aktivität dieser Kinase in Patienten mit einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung, die auf eine zentrale Rolle des MLCK-Signalweges schließen lassen (Blair et al. 2006). Zytokin-vermittelt ist vor allem die intestinale Konzentration des Tumor-Nekrose Faktors- α (TNF- α) und Interferon- γ (IFN- γ) entscheidend (Madara und Stafford 1989; Taylor et al. 1998). Hohe Konzentrationen dieser Zytokine, wie sie bei inflammatorischen Prozessen charakteristisch sind, induzieren eine Reorganisation der TJ-Proteine (v.a. ZO-1, JAM-A, Occludin, Claudin1 und 4) und damit eine erhöhte parazelluläre Durchlässigkeit durch IEZs. Dieser Mechanismus wird vermutlich ebenfalls über die Phosphorylierung des MLC (engl. *Myosin-light-chains*), durch die Zytokin-aktivierte MLCK, vermittelt (Zolotarevsky et al. 2002). Immunregulatorische Mechanismen zum Erhalt der intestinalen Homöostase, sind zum Beispiel durch eine erhöhte Differenzierung von regulatorischen T-Zellen (T_{regs}), induziert durch TGF- β und Retinsäure (RA), die wiederum über die Sekretion von Interleukin (IL)-10 der pro-inflammatorischen IFN- γ -Antwort entgegenwirken, charakterisiert (Coombes et al. 2007). Neue Erkenntnisse zeigen ferner, dass auch pathogene Mikroorganismen, wie zum Beispiel das enteropathogene *Escherichia coli* (EPEC), die intestinale Integrität über TJ-vermittelte, MLCK-abhängige, Regulationsmechanismen beeinflussen. Diese können über ihren direkten Kontakt den Zusammenhalt zwischen Occludin, ZO-1 und Claudin-1 destabilisieren und so die Dissoziation von apikalen TJ-Komplexen induzieren (Spitz et al. 1995; Muza-Moons et al. 2004). Als Antwort auf einen Pathogen-Stimulus (z.B. Lipopolysacchariden (LPS) oder IFN- γ) können IEZs die Expression induzierbarer Stickstoffmonoxid-Synthasen (iNOS) induzieren, um die intestinale Permeabilität aufrechtzuerhalten (Geller und Billiar 1998; Tepperman et al. 1994). Weiterhin induzieren aktivierte Neutrophile oxidative Stressreaktionen über die

Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Diese Reaktion kann in feinreguliertem Maß protektiv gegen mikrobiellen Befall wirken und damit schützend für die intestinale Barriere sein, in hohen Konzentrationen jedoch die Integrität des intestinalen Epithels schädigen und Mucin-Proteine depolymerisieren (Bhattacharyya et al. 2014; Harris et al. 1992).

1.1.2 Das intestinale Immunsystem: Ein Überblick

Neben den beschriebenen chemischen und mechanischen Barrieren des gastrointestinalen Traktes hat sich ein feinreguliertes Darm-assoziiertes Immunsystem entwickelt. Im Darm sind weit mehr Immunzellen beherbergt als in den restlichen lymphatischen Organen. Sie machen einen Anteil von 70% aller Immunzellen im menschlichen Körper aus und liegen konzentriert im intra-intestinalen Epithel und sub-epithelialen Regionen vor (Jung et al. 2010). Die Herausforderung des intestinalen Immunsystems liegt vor allem in der Regulation der empfindlichen Balance zwischen protektiven Immunantworten gegenüber potenziell schädlichen Antigenen (zum Beispiel pathogene Mikroorganismen oder Pathobionten) bei gleichzeitiger Toleranz gegenüber Nahrungsmittelantigenen und der kommensalen Mikroflora. Strukturell wird der induktive Teil des Darm-assoziierten lymphatischen Gewebes (GALT) aus den Darm drainierenden mesenterischen Lymphknoten (mLN), aggregierten Lymphfollikeln im Dünndarm und isolierten Lymphfollikeln (ILF) im Kolon gebildet (Mowat 2003).

Generell unterscheidet man zwischen dem angeborenen Immunsystem und dem adaptiven Immunsystem. Zu den Effektorzellen des angeborenen Immunsystems gehören hauptsächlich Makrophagen, DCs, Natürliche-Killerzellen (NK) und Mastzellen, aber auch nicht-professionelle Immunzellen wie beispielsweise IECs, Endothelzellen und Fibroblasten. Nach der Erkennung eines Pathogens anhand seiner pathogen-assoziierten Moleküle (PAMPs), kann das angeborene Immunsystem diese nach Bindung an ihre Mustererkennungsrezeptoren (PRR), wozu zum Beispiel die unterschiedlichen Toll-ähnlichen (TLRs) oder NOD-ähnlichen Rezeptoren (NLRs) gehören, phagozytieren oder mit Hilfe des adaptiven Immunsystems eine Antigen-spezifische Reaktion induzieren (Takeuchi und Akira 2010). Zellen des adaptiven Immunsystems sind T-Lymphozyten (zelluläre Immunantwort) und B-Lymphozyten (humorale Immunantwort). Nachdem die Lymphozyten des adaptiven Immunsystems zumeist durch den DC-vermittelten Antigenkontakt aktiviert wurden, wandern sie in die

Effektor-Regionen, d.h. in das intestinale Epithel und die Lamina Propria (LP) ein, um Immunreaktionen zu induzieren (Maynard et al. 2012). Nachfolgend werden für die vorliegende Arbeit zentrale, zelluläre Bestandteile des intestinalen Immunsystems isoliert betrachtet und in ihrer Funktion beschrieben. Wobei auf eine Betrachtung in der Gesamtheit, nicht zuletzt auf Grund der Vielzahl an Komponenten des intestinalen Immunsystems, verzichtet werden muss.

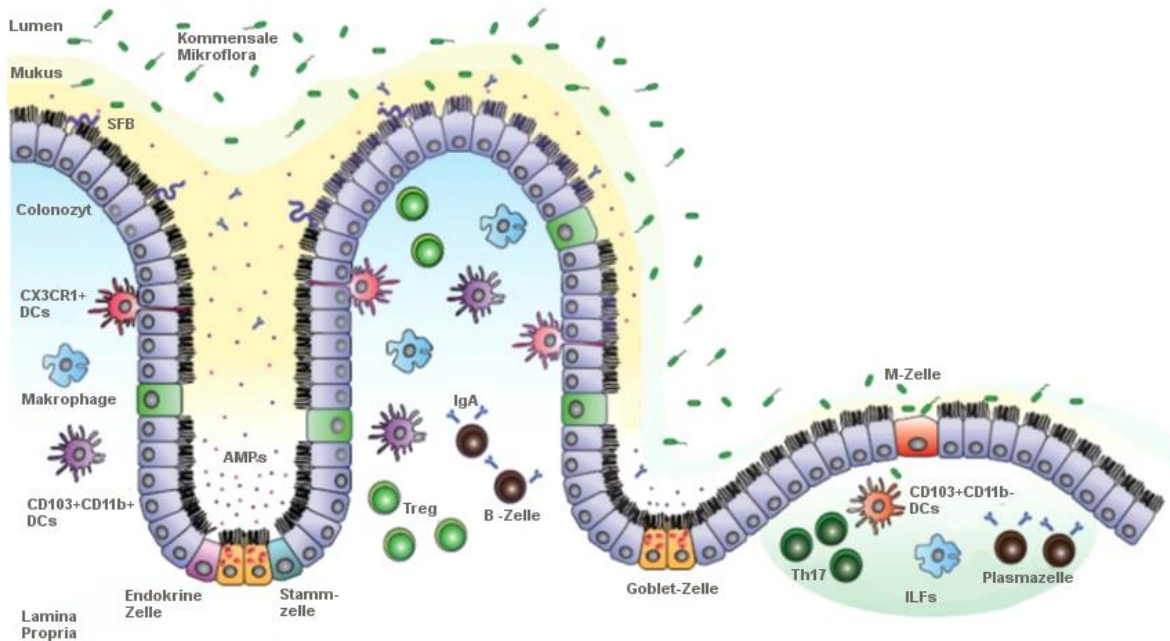


Abbildung 1-3: Das intestinale Immunsystem unter Homöostase. Die intestinale Barriere ist eine hoch organisierte mukosale Oberfläche und dient dem Schutz des Organsystems vor dem Eindringen von Mikroben in die Lamina Propria. Das intestinale Epithel wird von einer zweiphasigen Muzin-Schicht, in der AMPs, sekretierte IgAs und Muzin-Glykoproteine gelöst sind, bedeckt. Das darunterliegende einschichtige Epithel wird durch IEZ gebildet, die in 5 Subtypen differenzieren können: Enterozyten bzw. Kolonozyten im Kolon; Goblet-Zellen, endokrine Zellen, Paneth-Zellen (hauptsächlich in der Krypt-Basis des s.i., aber auch im Kolon zu finden) und M-Zellen. In der darunterliegenden Lamina Propria befinden sich die Zellen des Immunsystems z.B.: Makrophagen, Dendritische Zellen (DCs), die unterschiedlichen T-Zellpopulationen (T_H1 , T_H2 , T_H17 , T_{reg}) und IgA-produzierende Plasmazellen. s.i.: Dünndarm. Verändert nach (Muniz et al. 2012).

1.1.2.1 Das angeborene mukosale Immunsystem

Mononukleäre Phagozyten (MPs), zu denen sowohl Makrophagen als auch DCs zählen, sind wichtige Komponenten des intestinalen Immunsystems, um effektive aber antigen-unspezifische Immunantworten gegen potenziell schädliche Antigene auf der einen und Toleranzmechanismen auf der anderen Seite zu initiieren. Intestinale Makrophagen, die kontinuierlich von zirkulierenden Monozyten ersetzt werden, haben neben der Antigen-Präsentation essentielle Funktionen in der Phagozytose von apoptotischen Zellen, Modulation des intestinalen Gewebes, sind aber auch, über ihr spezifisches Zytokinprofil, an dem Erhalt der intestinalen Homöostase beteiligt (Bain et al. 2014). Durch ihre Position direkt unterhalb des intestinalen Epithels sind sie

prädestiniert, um Pathogene, die die physikalische Barriere durchbrochen haben, zu beseitigen (Pull et al. 2005). Im Unterschied zu peripheren Makrophagen, induziert der Kontakt mit Bakterien oder bakteriellen Komponenten bei intestinalen Makrophagen keine pro-inflammatorische Immunantwort oder Freisetzung von ROS, wonach sie einen hyporesponsiven Charakter besitzen (Smythies et al. 2005). In Bezug auf das Zytokinprofil sind intestinale Makrophagen jedoch nicht völlig anerg, sondern produzieren konstitutiv geringe Mengen an IL-10 und TNF- α . Phänotypisch zeichnen sich reife intestinale Makrophagen durch eine hohe Expression vom Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHCII), CX3CR1^{hoch} aus und sind ferner positiv für F4/80⁺ und *cluster of differentiation* (CD) 64. Des Weiteren exprimieren sie neben CD11b⁺ auch CD11c⁺ in moderaten Mengen auf ihrer Oberfläche (Bain et al. 2013). Das Paradigma von M1 und M2 Makrophagen in peripheren Geweben trifft auf intestinale Makrophagen nicht zu, da sie Eigenschaften von beiden aufweisen. So spricht die Expression von MHCII^{high} und TNF- α für M1 oder klassisch-aktivierte Makrophagen, während die Sekretion von IL-10 eher mit M2 oder alternativ-aktivierten Makrophagen assoziiert wird (Bain et al. 2013; Weber et al. 2011; Biswas und Mantovani 2010). Durch ihren nicht-migratorischen Charakter sind intestinale Makrophagen vermutlich nicht an initialen Differenzierungsprozessen von naiven T-Zellen beteiligt, induzieren jedoch durch ihre hohe MHCII-Expression eine sekundäre Expansion von T_{regs} und erhalten ihren suppressiven Phänotyp in Gegenwart eines inflammatorischen Milieus (Denning et al. 2007).

Im Gegensatz dazu stellen intestinale DCs, als professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APCs), eine Schlüsselkomponente in der Vermittlung zwischen oraler Toleranz und der Induktion von adaptiven Immunreaktionen dar (Steinman 2012). Intestinale DCs sind sowohl in der Lage naive intestinale CD4⁺ T-Zellen in den mLNs oder PPs zur Differenzierung in Effektor T-Zellen anzuregen (engl. *prime*) (Uematsu et al. 2008) als auch die Expansion von T_{regs} zu stimulieren (Coombes et al. 2007). Die genauen Mechanismen wie DCs den Wechsel zwischen einem tolerogenen hin zu einem aktivierenden Phänotyp vollziehen sind bislang nicht vollständig geklärt. Dabei beeinflusst die Natur des präsentierten Antigens sowie die dadurch initiierte Zytokin-Sekretion die klonale Expansion und Differenzierung in die unterschiedlichen T-Zellpopulationen (s. **Kap. 1.1.2.2**) (Steimle und Frick 2016). Diese Eigenschaft wird durch die Expression des C-C-Motiv-Chemokin-Rezeptors 7 (CCR7) auf der Oberfläche von DCs ermöglicht, wodurch sie ihren migratorischen Phänotyp erhalten,

um in die mLNs einwandern zu können (Schulz und Pabst 2013). Intestinale DCs können von Monozyten und Makrophagen durch ihre Expression von CD103⁺, CD11c⁺ MHCII⁺ F4/80⁻ und CD64⁻ unterschieden werden (Farache et al. 2013; Scott et al. 2015).

1.1.2.2 Das adaptive mukosale Immunsystem

Nach der Antigen-Präsentation über APCs und Bindung an den spezifischen T-Zell Rezeptor (TZR) erfolgt, abhängig vom Agens und dem dominierenden Zytokin-Milieu, die Induktion einer antigen-spezifischen protektiven, tolerogenen oder inflammatorischen Immunantwort. Diese Mechanismen, vermittelt durch die Vielzahl an Leukozyten im intra- und subepithelialen Kompartiment des intestinalen Gewebes, induzieren den Status einer „kontrollierten Entzündung“ und dienen dem Erhalt der intestinalen Homöostase (Biancone et al. 2002). Wichtige Komponenten um zwischen diesen empfindlichen Aufgaben zu vermitteln, sind die unterschiedlichen CD4⁺ T-Helferzellen (T_h), die über ihr spezifisches Zytokin- und Chemokinprofil weitere Zellen des Immunsystems aktivieren oder rekrutieren können. Bezüglich der Induktion intestinaler Immunreaktionen sind vor allem die Effektorfunktionen von T_h1, T_h2 und T_h17-Zellen und ihr regulatives Gegenstück, die T_{regs} von zentraler Bedeutung (**Abb. 1-4**). Dabei erkennen CD4⁺ T-Zellen nur Antigene die über MHCII präsentiert wurden (König et al. 1992).

Regulatorische T-Zellen, ursprünglich auch als Suppressor-Zellen benannt, zeichnen sich durch die Sekretion der anti-inflammatorischen Zytokine TGF-β und IL-10 aus. Zur Differenzierung benötigen sie vor allem TGF-β und die Transkription des FoxP3-Gens (engl. *forkhead-box 3*). Ihre zentralen Aufgaben liegen in dem Erhalt der Selbst-Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen, der Inhibierung von Autoimmunreaktionen und der Reduktion von Gewebeschäden während unterschiedlicher Infektionen (Sakaguchi et al. 2008). Im intestinalen Milieu bedeutet dies vor allem die symbiontische Beziehung zur intestinalen Mikroflora aufrechtzuerhalten (Gambineri et al. 2003). Von substanzieller Bedeutung ist dabei die Fähigkeit, neben IL-35 und IL-15, IL-10 zu sezernieren, um T_h1- und T_h17-Zellen zu inhibieren. Im Dünndarm übernehmen diese Funktionen sogenannte regulatorische T-Zellen vom Typ 1 (T_r1-Zellen: CD4⁺FoxP3⁺). Man unterscheidet dabei zwischen natürlichen (n) und induzierten (i) T_{regs}, je nach Ort ihrer Reifung. Wie der Name nT_{reg} bereits nahelegt, entwickelt sich diese Gruppe während der normalen T-Zell-Reifung im Thymus. Dabei

exprimieren nT_{regs} , bereits während sie den Thymus verlassen, stabil FoxP3 und zeichnen sich durch Antigen-Spezifität und Langlebigkeit in den peripheren Regionen aus (Mills 2004; Chen et al. 2003). Für die Induktion und Expansion von nT_{regs} ist IL-2 sowie eine Stimulation des TZR-CD3 Komplexes zusammen mit dem co-stimulatorischen Molekül CD28 notwendig (Tang et al. 2004). Im Gegensatz dazu entwickeln sich iT_{regs} direkt in den peripheren lymphatischen Organen, wobei TGF- β (sekretiert von apoptotischen Zellen) maßgeblich an der induzierten FoxP3-Expression beteiligt ist (Li et al. 2006). Dieser Mechanismus verdeutlicht die sensible Regulation des intestinalen Immunsystems gegenüber Selbst-Antigenen und bakteriellen Bestandteilen über das Verhältnis von Effektor-T-Zellen (T_{eff}) zu T_{regs} . In Studien, die das Modell des adoptiven Zelltransfers nutzten, konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Entwicklung einer chronischen Kolitis durch den zusätzlichen Transfer von T_{regs} rückgängig gemacht werden kann (Powrie et al. 1993). Die physiologische Reaktivität von T_h1 -Zellen gegen Bestandteile der kommensalen Mikrobiota z.B. gegen Polysaccharide der *Bacteroides*-Spezies (Mazmanian et al. 2005) oder aber T_h17 -Zellen gegen segmentierte filamentöse Bakterien (SFBs) (Ivanov et al. 2009), verdeutlichen die Notwendigkeit eines funktionalen T_{reg} -Kompartimentes. Daraus ergibt sich aber auch die protektive Funktion von T_h1 - und T_h17 -Zellen in der Abwehr einer potenziell schädigenden Kolonisierung des intestinalen Epithels durch kommensale Bakterien (Gautreaux et al. 1995). Weiterhin vermittelt das $CD4^+$ T-Zellkompartiment über seine Kommunikation mit intestinalen Phagozyten und Epithelzellen eine Steigerung ihrer antimikrobiellen Funktionen, die einen weiteren Mechanismus zur Prävention vor opportunistischen Infektionen darstellt. Dabei induziert das T_h1 -Zytokin IFN- γ die Aktivierung von Makrophagen, die im Umkehrschluss IL-12 ausschütten und damit weitere T_h1 -Zellen aktivieren (positiver *Feedback-Loop*). Eine ähnliche Situation ergibt sich für intestinale T_h17 -Zellen, die durch ihre IL-22 Sekretion die Produktion von AMPs unterstützen. Weitere Produkte von T_h17 -Zellen wie IL-17A und IL-17F rekrutieren Neutrophile oder können die Funktion von T_{regs} über IL-21 inhibieren (Weaver et al. 2006). Zusammen favorisiert das dynamische gastrointestinale System den Status sogenannter physiologischer Toleranz maßgeblich über das Kompartiment regulatorischer T-Zellen (Geuking et al. 2011). Unter homöostatischen Bedingungen sind T_h2 -Zellen, vermutlich auf Grund der nahezu ausgestorbenen Besiedlung des GI mit Helminthen in industrialisierten Ländern nur in geringer Frequenz im GI zu finden (Blaser und Falkow 2009; Umetsu et al. 2002). Ferner können sich T_h1 und T_h2 -Zellen gegenseitig inhibieren, wodurch

die Anzahl von T_H2 -Zellen ebenfalls limitiert wird (T_H1 -Zellen über $IFN-\gamma$; T_H2 -Zellen über IL-4) (Gajewski und Fitch 1988; Rafael Fernandez-botran 1988).

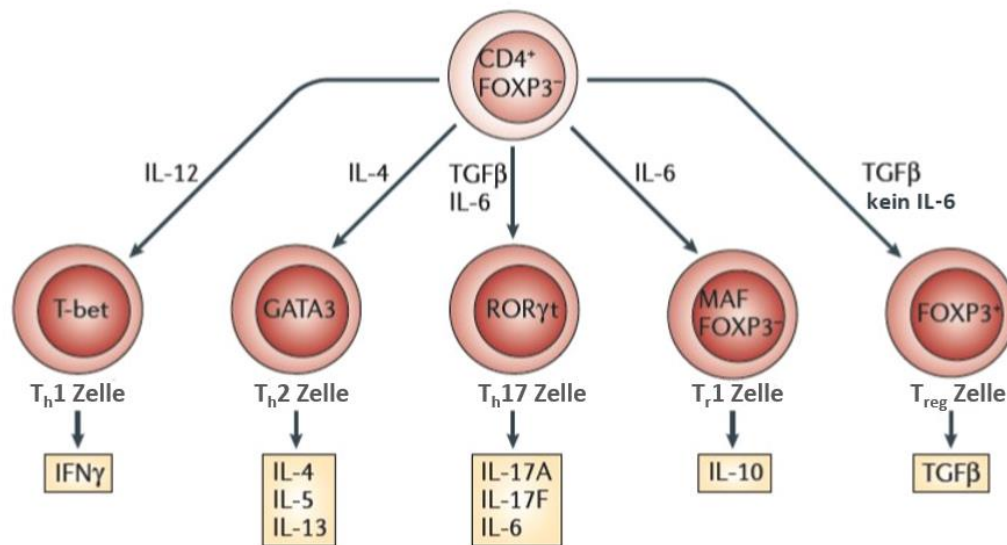


Abbildung 1-4: CD4⁺ T-Zell-Populationen und ihre Differenzierungsfaktoren. Die Differenzierung in die unterschiedlichen CD4⁺ T-Zell-Populationen erfolgt in Abhängigkeit des Zytokin-Milieus und verschiedenen Transkriptionsfaktoren. Übernommen von (Hooper und Macpherson 2010).

CD8⁺ T-Zellen, häufig auch als zytotoxische T-Zellen (ZTL oder T_c1) bezeichnet, schützen vor intrazellulären Krankheitserregern (z.B. Viren, Bakterien, Parasiten, entarteten Zellen). Nach dem MHC-I-vermittelten Antigenkontakt kann eine T_c1 -Zelle die betreffende Zielzelle über drei unterschiedliche Mechanismen abtöten (Cresswell et al. 2005). Erstens über die Sekretion spezifischer Zytokine, hauptsächlich $TNF-\alpha$ und $IFN-\gamma$, die eine anti-tumor bzw. anti-mikrobielle Wirkung besitzen. Zweitens können sie zytotoxische Granula produzieren, deren Inhalt durch Perforin und unterschiedlichen Granzymen dominiert ist. Dabei ist anzumerken, dass zytotoxische Granula neben T_c1 -Zellen auch von NK-Zellen des angeborenen Immunsystems produziert werden können. Ein dritter Mechanismus, eine infizierte Zelle zu zerstören, ist die Interaktion zwischen dem Todesrezeptor Fas (APO-1, CD95) mit dem Fas-Liganden (Harty et al. 2000).

1.1.2.3 Co-inhibitorische Toleranzmechanismen

Viele periphere Mechanismen der Toleranzinduktion von T-Zellen, wie zum Beispiel die immunologische Ignoranz, oder klonale Deletion autoreaktiver T-Zellen und Suppression durch regulatorische T-Zellen und Zytokine sind bis heute anerkannt (Kamradt et al. 2003). In wie weit diese Mechanismen auch auf das mukosale

Immunsystem übertragbar sind, ist bis heute Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen. Dies liegt in den einzigartigen anatomischen und physiologischen Eigenschaften des mukosalen Immunsystems begründet. Unter mukosaler Immuntoleranz versteht man die Induktion von regulatorischen Mechanismen, die dem Schutz der intestinalen Mikroflora und Integrität vor der Entwicklung von autoreaktiven, hyper-inflammatorischen T-Effektorzellen dienen (Liu und Lefrancois 2004). Die indirekte Regulation von Effektor-T-Zellen über sogenannte co-inhibitorische Moleküle ist dabei von wachsendem wissenschaftlichen Interesse und deren Dysregulation vor allem in Mausmodellen von chronisch-viralen Infektionen und der Tumorbilogie untersucht worden (Blackburn et al. 2008; Fourcade et al. 2010). Bei diesen Erkrankungen, die durch eine persistierende Antigen-Exposition oder Entzündung charakterisiert sind, können die normalen regulativen Prozesse gestört sein und einen veränderten T-Zellphänotyp (engl. *T-cell exhaustion*) induzieren. Dieser zeichnet sich durch einen progressiven Verlust der Effektor-T-Zellfunktion und einer drastisch erhöhten Expression von inhibitorischen Molekülen aus. Zu den bekanntesten co-inhibitorischen Rezeptoren gehören der programmierende Todesrezeptor 1 (PD-1) (Zhang et al. 2004), das zytotoxische T-Lymphozyten Antigen 4 (CTLA-4) (Walunas et al. 1994), das aktivierende Lymphozyten Gen 3 (LAG-3) (Huang et al. 2004) und das T-Zell Immunglobulin 3 (TIM-3) (Monney et al. 2002). Die Mehrzahl co-inhibitorischer Moleküle gehört der Immunglobulin-Superfamilie an und ihre funktionsweise kann in drei Mechanismen unterteilt werden (Odorizzi und Wherry 2012). Der erste Mechanismus, um eine T-Zelle zu inhibieren, schränkt die optimale Signaltransduktion auf der Zelloberfläche über Interaktionen (kompetitiver Antagonismus) mit den co-stimulatorischen Rezeptoren ein und wird beispielsweise von CTLA-4 und Lag-3 verwendet. Der zweite Mechanismus betrifft die Rekrutierung von intrazellulären Phosphatasen durch die intrazellulären ITIM-Motive (engl. *immunoereceptor tyrosin-based inhibitory motives*) der co-inhibitorischen Rezeptoren. Dabei werden die Signalmoleküle des co-stimulatorischen Signalweges angegriffen und damit deren aktivierungsinduzierte Genexpression inhibiert. Zu den co-inhibitorischen Rezeptoren, die diesen Signalweg verwenden zählen PD-1, CTLA-4 und TIM3 (Thaventhiran 2013). Als letzter Mechanismus ist die Induktion weiterer Gene des inhibitorischen Signalweges zu nennen und kann beispielsweise ebenfalls von PD-1 verwendet werden (**Abb. 1-5**) (Odorizzi und Wherry 2012).

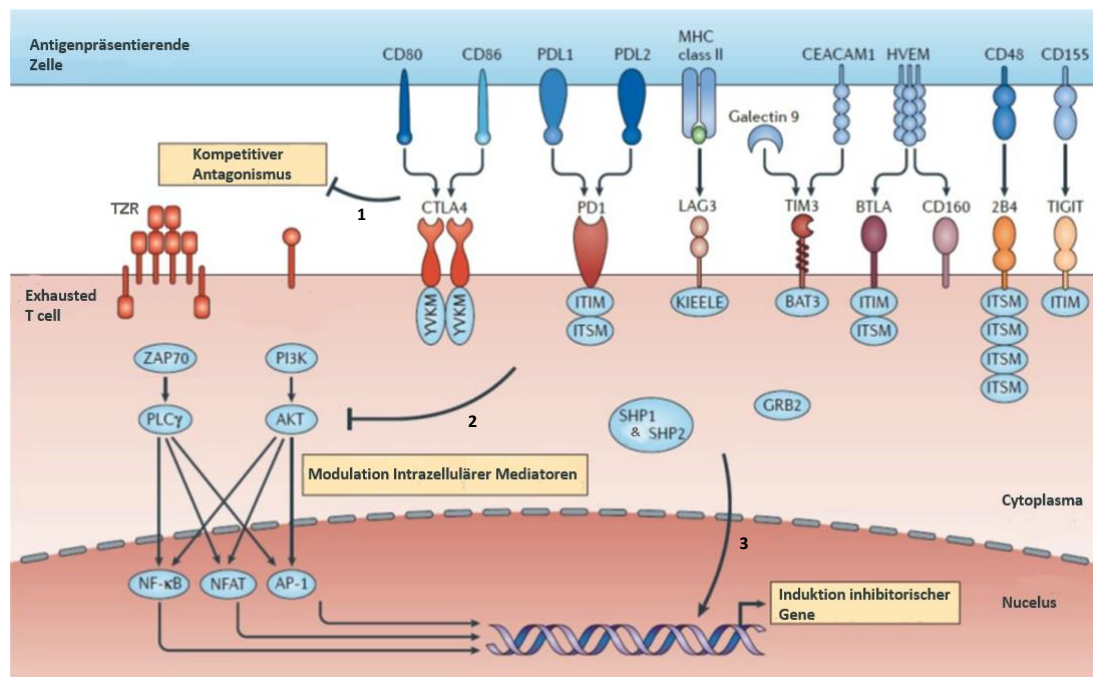


Abbildung 1-5: Co-inhibitorische Moleküle und Interaktionen zur Regulation der T-Zellfunktion. Dargestellt sind die Liganden und Rezeptorverbindungen für die Signaltransduktion von inhibitorischen Signalwegen die zum Phänotyp der T-Zell Ermüdung (engl. exhausted) beitragen. Viele dieser Rezeptoren besitzen zur Signaltransduktion *immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motifs* (ITIMs) oder aber *immunoreceptor tyrosine-based switch motifs* (ITSMs). Die Signaltransduktion wird hauptsächlich über 3 Mechanismen vermittelt. **1)** Durch den kompetitiven Antagonismus, **2)** der Modulation intrazellulärer Mediatoren oder **3)** durch die Induktion inhibitorischer Gene. **AP-1:** aktivierendes Protein 1; **BAT:** HLA-B assoziiertes Transkript 3; **BTLA:** B- und T-Lymphozyt assoziiertes Protein; **CEACAM1:** Carzinoembryonales Antigen-ähnliches Zelladhäsionsmolekül 1; **CTLA-4:** zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4; **GRB2:** growth factor receptor-bound protein 2; **HVEM:** Eintrittsmittler des Herpes Virus; **Lag3:** das aktivierende Lymphozyten Gen 3; **NFAT:** nuclear factor of activated T-cells; **NfκB:** nuclear-factor-κB; **PD-1:** programmierender Todesrezeptor 1; **PD1L:** PD-1 Ligand; **PI3K:** Phosphoinositid-3-Kinasen; **PLCγ:** Phospholipase Cy; **TIGIT:** T-Zell Immunrezeptor mit ITIM und Immunglobulin Domänen; **TIM-3:** T-Zell Immunglobulin 3. Verändert nach (Wherry und Kurachi 2015).

Die induzierte Expression von PD-1 auf aktivierten T-Effektorzellen ist homogen verteilt, bevorzugt jedoch in Nähe der TZR, um eine erfolgreiche Bindung an seinen Liganden PDL-1 (konstitutiv auf T- und B-Zellen, DCs, Makrophagen, mesenchymalen Stammzellen und Mastzellen exprimiert) und PDL-2 (induzierte Expression auf DCs und Makrophagen und Mastzellen) zu garantieren (Bennett et al. 2003). Die Expression von PD-1 ist dabei abhängig von der Stärke der TZR-Stimulation. So induzieren z.B. starke TZR-Stimuli eine hohe PD-1 Expression (Wei et al. 2013). Die Bindung von PD-1 an seinen Liganden kann sowohl Einfluss auf die Expression anti-apoptotischer Moleküle (z.B. Bcl-XL) als auch von Effektor-assoziierten Molekülen wie GATA-3, T-bet und Eomes haben (Chemnitz et al. 2004; Keir et al. 2008). Das co-inhibitorische Molekül Lag3 bindet hingegen mit hoher Affinität an die MHCII-Moleküle von APCs (Hemon et al. 2011). Funktionell führt der inhibitorische Signalweg von Lag-3 u.a. zu einer Stagnation der T-Zellentwicklung in der S-Phase, limitiert die Expansion aktivierter T-Zellen und kontrolliert die Größe des T-Zell-Gedächtnis-

repertoires (Workman et al. 2004). Die Expression von TIM-3 ist hauptsächlich auf das IFN- γ -produzierende T_h1 und T_c1-Zellkompartiment beschränkt, kann aber auch auf Makrophagen und DCs detektiert werden, wo es möglicherweise eine Funktion in der Beseitigung von apoptotischen Bestandteilen besitzt (Sakuishi et al. 2011). Die Bindung von TIM-3 an seinen Liganden Galectin-9, ein Mitglied der S-Typ Lektine, induziert Prozesse der Zellaggregation und den Zelltod von T_h1, nicht aber von T_h2-Zellen. Daher stellt die Co-Inhibition von TIM-3 einen negativen Rückkopplungsmechanismus gegen unkontrollierte und schädigende T_h1-Immunreaktionen dar (Ahmed und Honjo 2011). Neben Galectin-9 weisen neueste Studien auf CEACAM1 (**Kap. 1.2.1**) als weiteren Interaktionspartner von TIM-3 hin (Huang et al. 2015).

1.2 Zelladhäsionsmoleküle-CEA

Die Familie der Carzinoembryonalen Antigene (CEA) gehört der Immunglobulin Superfamilie von Zelladhäsionsmolekülen (IgCAM) an, die über 29 Gene und 11 Pseudogene auf dem Chromosom 19q13.2 codiert werden (John A. Thompson et al.). Die zugehörigen Mitglieder dieser Proteinfamilie werden in CEA-Zelladhäsionsmoleküle (CEACAMs) und schwangerschaftsspezifische Glykoproteine PSGs (engl. *pregnancy-specific glycoproteins*), anhand ihrer Homologien und Expressionsprofile, unterteilt (Hammarstrom 1999). CEACAMs sind auf Zelloberflächen lokalisiert, wohingegen PSGs sekretiert werden. Charakteristisch ist ein breites Expressionsprofil auf Endothel-, Epithel- und Immunzellen. In ihrer Gesamtheit sind CEACAMs an der Modulation von interzellulären Adhäsionsprozessen und Signaltransduktionskaskaden beteiligt, können aber auch als Pathogenrezeptoren fungieren (Öbrink 1997; Muenzner et al. 2000). Strukturell zeichnen sich die Mitglieder dieser Familie durch eine extrazelluläre Domäne bestehend aus hochkonservierten IgV-ähnlichen N-Domänen (engl. *immunoglobulin variabel-region-like N domain*) und davorliegende IgC2-ähnliche Domänen (engl. *immunoglobulin constant-region-type-2-like domain*) aus, die in variabler Anzahl exprimiert werden. (Hammarstrom 1999). Der Membrankontakt wird entweder über einen Glykophosphatidylanker (CEACAM5-8) oder über eine Transmembranverbindung (CEACAM1, 3-4) hergestellt (vgl. **Abb. 1-6**). Für die weitere Signaltransduktion ist vor allem die Beschaffenheit der transmembranen bzw. zytoplasmatischen Domäne wichtig (Dveksler et al. 1993). In intestinalen Epithelzellen des Menschen werden v.a. 4 Mitglieder der CEA-Familie auf der luminalen Seite oder der Kryptbasis exprimiert (hCEACAM1 und hCEACAM5-7). Diese Mitglieder sind unterhalb der inneren Muzin-Schicht, eingebettet in einer dichten Glycokalix,

lokalisiert. Interessanterweise weisen Goblet-Zellen eine Expression von hCEACAM5 und hCEACAM6 auf (Lars Frängsmyr et al. 1995; Frängsmyr et al. 1999). Insbesondere hCEACAM5 (auch als CEA bezeichnet) findet bis heute als Biomarker bei Patienten mit der Diagnose von Kolonkarzinomen Verwendung, um zum Beispiel die Reaktion nach einer Chemotherapie zu dokumentieren (Goldstein und Mitchell 2005).

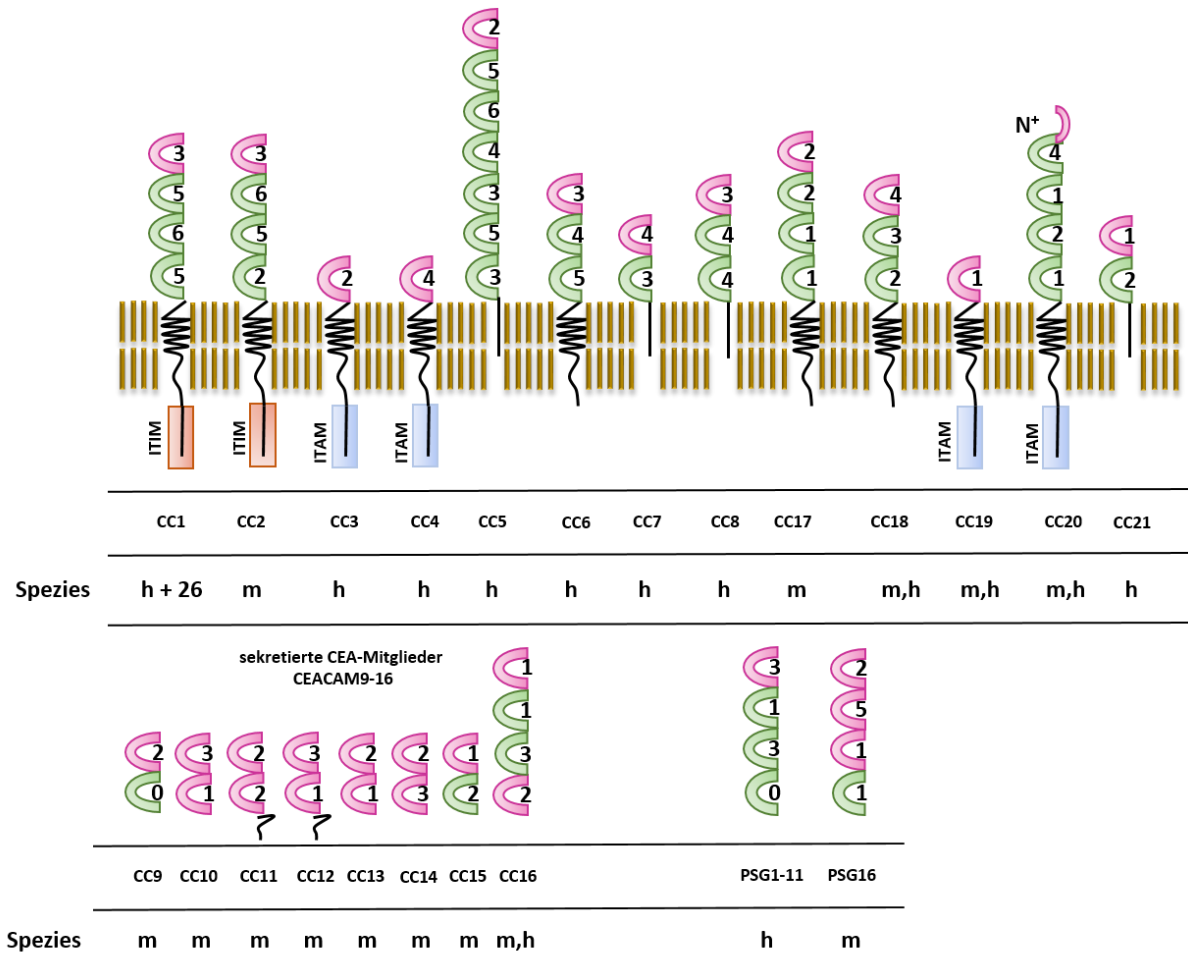


Abbildung 1-6: Die humane CEA-Immunglobulin Superfamilie. Dargestellt sind alle 12 Mitglieder der humanen CEA-Familie. Strukturell zeichnen sie sich durch eine variable IgV-ähnliche N-Domäne (rot) und konstante IgC2-Domänen aus (grün). CEACAM5-8 und 21 sind mit der Membran über einen Glykophosphatidylanker, wohingegen die übrigen durch bona fide Transmembranverbindung, verbunden sind. CEACAM1 besitzt, im Gegensatz zu den anderen, keine *immunoreceptor tyrosin-based activation*-Motive ITAM-Motive (blaue), sondern zwei ITIM-Motive (rot). CC: CEACAM; h: human; m: murin; PSG: pregnancy-specific glycoproteins. Nummern geben die Anzahl der Glykolysierungsstellen an. Verändert nach (Zebhauser et al. 2005; Gray-Owen und Blumberg 2006; Kammerer und Zimmermann 2010; Kuespert et al. 2006).

1.2.1 CEACAM1

Das CEA-ähnliche Zelladhäsionsmolekül 1 (CEACAM1, auch als CD66a, Bgp1 bezeichnet) weist von allen Mitgliedern dieser Familie die größte Verteilung in den unterschiedlichen Geweben im Wirbeltierorganismus auf und ist eines von wenigen

Mitgliedern, dessen Homologe auch in Nagetieren nachgewiesen werden konnten (Zebhauser et al. 2005). Die Erstbeschreibung erfolgte durch Gold und Freedman im Jahr 1965 in Kolonkarzinomen (Gold & Freedman, 1965). Später folgten Nachweise in verschiedenen Epithelien, Endothelien und Leukozyten (Watt et al. 1991; Muenzner et al. 2000; Möller et al. 1996; Khan et al. 1993; Öbrink 1997). Über alternative *Splicing*-Prozesse können im Menschen 12 und in der Maus 4 Isoformen von CEACAM1 unterschieden werden (**Abb. 1-7**). Die hohe Anzahl an Isoformen kommt durch die variable Anzahl der IgC₂-ähnlichen, extrazellulären Domänen aber auch durch die Länge der intrazellulären Domänen, die entweder lang (L) oder kurz (S) sein können, zustande. Die L-Isoformen exprimieren zwei ITIM-Motive in ihrer zytoplasmatischen Domäne, über die hauptsächlich inhibitorische Signale geniert werden, wohingegen die CEACAM1-S Isoformen keine ITIMs besitzen, aber durch ihre Interaktionsfähigkeit mit Calmodulin, Aktin und Tropomyosin vermutlich regulatorische Aufgaben bei der Organisation vom Zytoskelett übernehmen (Chen et al. 2004; Schumann et al. 2001; Gray-Owen und Blumberg 2006). Ferner ist die relative Verteilung zwischen CEACAM1L- und CEACAM1S Isoformen variabel und kann sich je nach Zelltyp, Differenzierungsstadium und Aktivierungsstatus verändern (Bernhard B. Singer et al. 2000). Die Funktion von CEACAM1 als interzelluläres Adhäsionsmolekül kann entweder durch homophile Interaktionen (CEACAM1-CEACAM1) oder über heterophile Interaktionen (CEACAM1-CEACAM5, 6 und 8) initiiert werden (Watt 2001; Stern et al. 2005; Singer et al. 2014; Oikawa et al. 1992). Die bisher bekannten Funktionen von CEACAM1 sind sehr umfassend. So konnte ein Zusammenhang zwischen dem CEACAM1 Expressionsprofil und der Tumorgenese dokumentiert werden, da ein wechselndes Expressionsprofil in den unterschiedlichen Krebserkrankungen festgestellt werden konnte. Beispielsweise ist die CEACAM1 Expression in der frühen Tumorgenese von Kolonkarzinomen, Brust- und Prostatakrebs reduziert, aber in metastasierenden Kolonkarzinomen hochreguliert, was auf eine Funktion in der Tumorentwicklung schließen lässt (Leung et al. 2008; Horst und Wagener 2004; Zhou et al. 2017). Ferner übernimmt CEACAM1 regulative Aufgaben in angeborenen und adaptiven Immunprozessen. So steigt zum Beispiel die Expression von CEACAM1 auf aktivierten T-Zellen nach Stimulation ihres TCR-CD3 Komplexes oder in Gegenwart von IL-2, IL-7 und IL-15 rapide an (Möller et al. 1996; Donda et al. 2000). B-Zellen zeigen hingegen eine konstitutive Expression, unabhängig von ihrem Aktivierungsstatus (Greicius et al. 2003). Zusammenfassend unterstützt CEACAM1 viele Zellfunktionen wie Proliferation (Singer, Bernhard B. et al.

2001), Differenzierung, Morphogenese und Apoptose (Nittka et al. 2004) und ist vermutlich an regulativen Prozessen der intestinalen Homöostase beteiligt (Hammarstrom und Baranov 2001). Letztere ist von großem wissenschaftlichen Interesse, da die Expression von CEACAM1 auf T-Zellen während chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen und Zöliakie erhöht ist (Morales et al. 1999; Donda et al. 2000; Costello et al. 2005). Ferner zeigen Mäuse in denen der Signalweg von CEACAM1, z.B. über die Verwendung eines CEACAM1 spezifischen Antikörpers moduliert wurde, eine verminderte Pathophysiologie während einer Trinitrobenzonsulfonsäure (TNBS) oder Oxazolone-induzierten Kolitis (Iijima et al. 2004). Insgesamt stützen diese Erkenntnisse die Hypothese, dass CEACAM1 an der Modulation der gastrointestinalen Homöostase beteiligt sein könnte und als co-inhibitorischer Rezeptor von T-Zellen ebenfalls bei der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze von besonderem Wert sein kann.

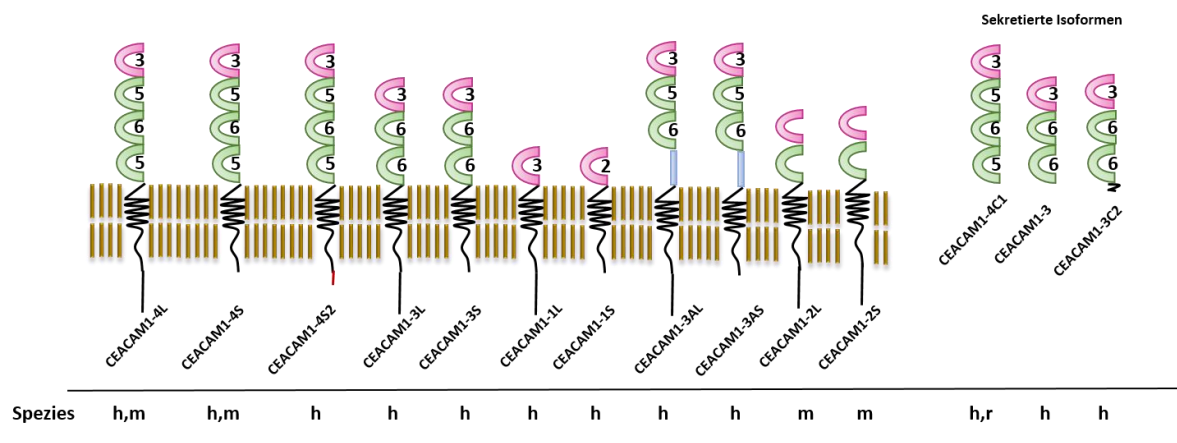


Abbildung 1-7: CEACAM1-Isoformen. Durch den Prozess des alternativen Splittings steigert sich die Vielfalt von CEACAM1 um 12 Isoformen im humanen und 4 im murinen Organismus. Dargestellt sind neben den variablen IgV- und IgC2-ähnlichen Domänen die charakteristischen langen (L) und kurzen (S) Isoformen, sowie die sekretierten Isoformen ohne Membranverbund. **CC:** CEACAM; **h:** human; **m:** murin; **PSG:** pregnancy-specific glycoproteins; Nummern geben die Anzahl der Glykosylierungsstellen an (für CEACAM1-2L und 1-2S unbekannt). Verändert nach (Beauchemin und Arabzadeh 2013; Budt et al. 2002; Gray-Owen und Blumberg 2006).

1.3 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

Mit dem Begriff chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) werden im Wesentlichen zwei unterschiedliche Krankheitsbilder, zum einen Kolitis Ulcerosa (KU) und zum anderen Morbus Chron (MC), beschrieben. Beide Krankheitsbilder sind durch chronisch rezidivierende Entzündungsreaktionen des gastrointestinalen Traktes charakterisiert und verlaufen in der Regel schubweise, unterbrochen von symptomarmen oder symptomfreien Intervallen (Remissionsphasen) (Neurath und

Finotto 2006). In den letzten Jahrzehnten ist das wissenschaftliche Interesse zum einen auf Grund der hohen Prävalenz (KU: 505; MC: 322 pro 100.000 Personen) und Inzidenz (KU: 24,3; MC 12,7 pro 100.000 Personen/Jahr) (Molodecky et al. 2012) der an CED erkrankten Personen, aber auch auf Grund der komplexen Ätiologie, die die Entwicklung von kausalen therapeutischen Maßnahmen erschweren, stark angestiegen. Daher beschränken sich bisherige therapeutische Maßnahmen auf die Therapie der Symptomatik mit dem Ziel einer Remissionsinduktion und dem anschließenden Remissionserhalt (Zenlea und Peppercorn 2014).

Personen die an CED leiden, sind in ihrer Lebensqualität stark eingeschränkt. So sind häufige klinische Leitsymptome eine erhöhte Stuhlfrequenz, Diarrhöe, krampfartige Bauchschmerzen, perianale Läsionen und Gewichtsverlust (Podolsky 2002). Für eine Diagnostik kommt erschwerend hinzu, dass die beschriebenen Symptome sehr variabel sind und eine weitreichende Anamnese erfordern, wodurch eine Diagnose meist verzögert erfolgt (Baumgart und Sandborn 2012). Des Weiteren sind CED-Patienten für Folgeerkrankungen, wie zum Beispiel der Entwicklung von kolorektalen Karzinomen, anfälliger (20% der CED Patienten) (Lakatos 2008). Im Unterschied zu KU, handelt es sich bei MC um eine diskontinuierliche transmurale Entzündung, die den gesamten gastrointestinalen Trakt betreffen kann. Typischerweise findet man zwischen den entzündeten Regionen auch gesunde Bereiche (engl. *skip lesions*) (Mathews et al. 1971). Häufig manifestieren sich diese am distalen Bereich des Dünndarms (terminales Ileum, in 45 %) und im Kolon (32 %), wohingegen Ösophagus, Magen, Duodenum und proximale Bereiche des Dünndarms deutlich seltener befallen sind (Thia et al. 2010). Bei KU handelt es sich hingegen um eine kontinuierliche Entzündung meist auf die rektalen Bereiche des Kolons, beschränkt. Wenn das gesamte Kolon betroffen ist, spricht man von einer Pankolitis (Taylor 1966). Ein weiteres charakteristisches Merkmal ist die Limitation der Entzündungen auf die Mukosa und Submukosa (Khor et al. 2011a).

1.3.1 Ätiologie und Pathogenese

Bis heute konnte die Ätiologie von CED nicht abschließend aufgeklärt werden. Derzeitige Erkenntnisse lassen aber auf eine multifaktorielle Erkrankung, ausgelöst durch eine komplexe Interaktion zwischen Umwelteinflüssen, intestinalem Mikrobiom, immunologischen Reaktionen und genetischer Disposition, schließen (Karlinger et al. 2000) (vgl. **Abb. 1-8**). Dabei stützen wissenschaftliche Studien aktuell die Hypothese,

dass CED das Resultat einer dysfunktionalen intestinalen Barriere sein könnte, woraufhin eine fehlgeleitete Immunreaktion gegen luminal Antigenen in genetisch prädisponierten Menschen eingeleitet wird (Mankertz und Schulzke 2007). Neben der Hypothese CED als Barriere-Erkrankung zu bezeichnen wird weiterhin der Zusammenhang von CED als Folge einer Infektion durch potenziell pathogene Mitglieder des intestinalen Mikrobioms kontrovers diskutiert (**Kap. 1.3.1.2**).

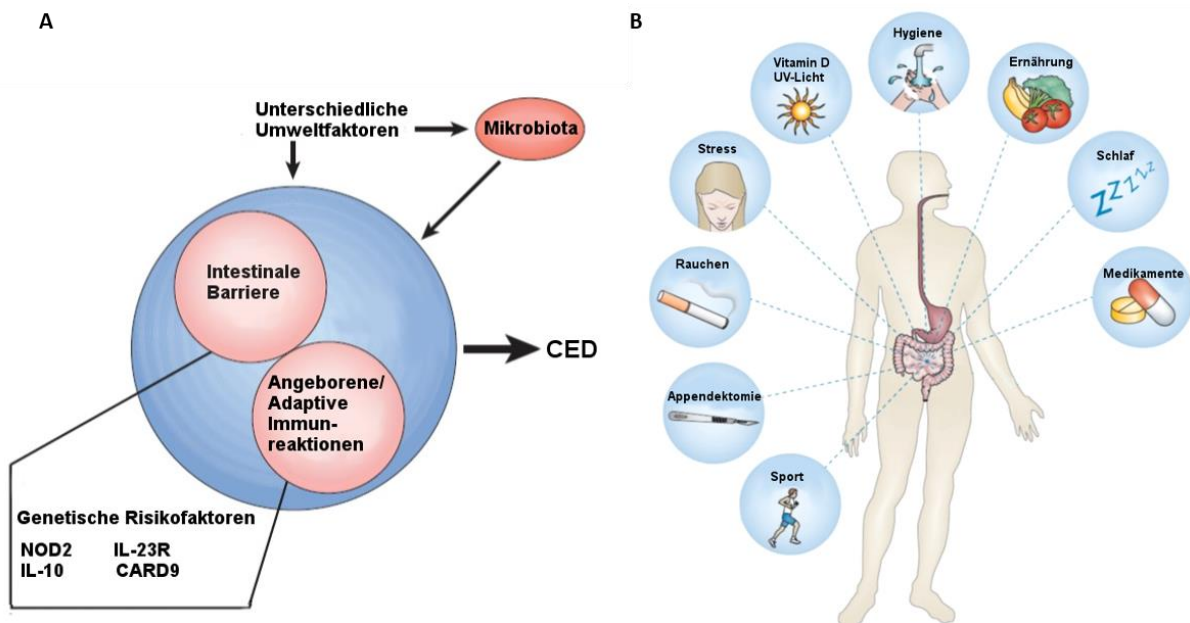


Abbildung 1-8: CED als multifaktorielle Erkrankung. A) Derzeitige Hypothese für die Ätiologie von CED. **B)** Bekannte Umweltfaktoren. Vermutlich entsteht CED aus der Wechselwirkung von, intestinaler Mikrobiota und genetischen Risikofaktoren, die letztlich in einer fehlgeleiteten Immunantwort des angeborenen und adaptiven Immunsystems enden. Verändert nach (Ananthakrishnan 2015) und (Xavier und Podolsky 2007).

1.3.1.1 Umweltfaktoren

Zu einem der bekanntesten Umweltfaktoren gehört zum Beispiel das Rauchen. Zwischen KU und Rauchen besteht eine inverse Korrelation, so wurde in einer Kohorte von aktiven Rauchern ein protektiver Effekt auf die Entwicklung von KU gefunden, wohingegen Ex-Raucher eine höhere Inzidenz besitzen. Ferner wirkt sich aktives Rauchen negativ auf die Entwicklung einer MC aus, da es mit einem aggressiveren Verlauf aber auch einem früheren Krankheitsausbruch einhergehen kann (Harries et al. 1982; Mahid et al. 2006). Neben diesem konnten bestimmte Medikamente (Schmerzmittel (z.B.: NSAIDs) in hohen Dosen über einen längeren Zeitraum) (Ananthakrishnan et al. 2012), Ernährung (arm an Obst und Gemüse) (Ananthakrishnan et al. 2013) aber auch Stress (Bonaz und Bernstein 2013) als Risikofaktoren identifiziert werden.

1.3.1.2 Intestinales Mikrobiom/Barriere

Der Einfluss des Mikrobioms kann wie bereits in **Kapitel 1.1.1** beschrieben von Vorteil, aber im Falle einer Dysbiose negative Auswirkungen für den Wirt haben. Dies konnte in den letzten Jahren durch Entzündungsreaktionen in Mausmodellen oder CED-Patienten nachgewiesen werden (Tamboli 2004; Farrell und LaMont 2002; Tamboli 2004). So zeigte sich zum Beispiel, dass für Kolitis-Mausmodelle eine diverse Mikrobiota benötigt wird um überhaupt Entzündungsprozesse analysieren zu können, denn bei IL-10-defizienten Mäusen, die unter sterilen (engl. *germ-free*; GF) Bedingungen gehalten wurden, entwickelte sich keine *Helicobacter hepaticus* induzierte Kolitis (Dieleman et al. 2000). Auf der anderen Seite konnte eine protektive Funktion der Mikrobiota in dem Modell der Dextran-Natrium-Sulfat (DSS)-induzierten Kolitis gezeigt werden, in dem DSS WT-Mäuse im Gegensatz zu den GF-Mäusen einen milderen Verlauf der Kolitis zeigten. Im humanen System wirkte sich die Behandlung mit bestimmten Antibiotika bei einigen CED-Patienten positiv auf den Krankheitsverlauf aus, wobei jedoch unklar ist, ob dieser Effekt über kommensale oder pathogene Mikroorganismen vermittelt wurde (Elson et al. 2005). Des Weiteren ist seit langem bekannt, dass CED-Patienten starken Veränderungen ihres Mikrobioms unterliegen (Swidsinski et al. 2002). So zeigen sie eine reduzierte Diversität von *Lactobacilli* oder ein starkes Wachstum von *adherent-invasive E. coli* Stämmen (AICD), die möglicherweise eine verschlimmerte Symptomatik mit sich führen (Darfeuille-Michaud et al. 2004; Pineton de Chambrun et al. 2008). Des Weiteren konnten Studien eine reduzierte Frequenz von *Firmicutes* und *Bacteroidetes* und eine zunehmende Anzahl von *Actinobacteria* und *Proteobacteria* in CED-Patienten zeigen (Frank et al. 2007). Trotz dieser Veränderungen ist festzuhalten, dass die mikrobielle Diversität in ihrer Gesamtheit bei CED-Patienten reduziert ist (Frank et al. 2011; Chiodini et al. 2012). Diese Studien weisen zusammen auf eine Wechselwirkung zwischen intestinalem Mikrobiom und immunologischen Prozessen von CED hin. Dabei konnte bisher jedoch kein spezifisches Mitglied identifiziert werden, dass kausal die beschriebenen Effekte vermittelt, sodass die Hypothese von CED als „klassische Infektionserkrankung“, unwahrscheinlich scheint (Frank et al. 2011). Ferner bleibt zu untersuchen, ob die reduzierte Diversität von CED-Patienten ein initialer Faktor bei der Pathogenese oder als Folge der chronischen-entzündlichen Prozesse entsteht. Darüber hinaus spielt die intestinale Barriere eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von intestinalen Entzündungsreaktionen (Turner 2006). In CED-Patienten und über *in*

vitro Studien konnte zum Beispiel eine erhöhte intestinale Permeabilität mit einer erhöhten Claudin-2 Expression, als Bestandteil der TJ-Multiproteinkomplexe, in Verbindung gebracht werden. Daraus resultierte eine diskontinuierliche TJ-Formation und es wird angenommen, dass Makromoleküle über diesen Weg den parazellulären Raum durchdringen und vermutlich die disruptiven Immunreaktionen initiieren bzw. dazu beitragen könnten (Prasad et al. 2005). Des Weiteren stellt die Muzin-Schicht als Reservoir von zahlreichen AMPs eine wichtige Schutzfunktion der intestinalen Barriere dar, sodass eine Dysfunktion eine Beeinträchtigung sowohl der Barrierefunktion als auch der intestinalen Mikrobiota zur Folge haben könnte (vgl. **Kap. 1.1.1**) (Johansson et al. 2008). Studien zeigten beispielsweise eine positive Korrelation zwischen reduzierter HD5 und HD6 (α -Defensin 5 und 6) Expression und der Pathogenese von ileal-manifestiertem MC (Wehkamp et al. 2005b; Simms et al. 2008).

1.3.1.3 Genetische Faktoren

Erstmals konnte ein Zusammenhang zwischen genetischen Faktoren und der Entwicklung von CED über die Analysen der familiären Verhältnisse gewonnen werden. Dabei wiesen 2-14% der erkrankten CED-Patienten eine familiäre Geschichte auf. Ferner konnte eine erhöhte Konkordanz von 20-50% in monozygotären Zwillingen die Beteiligung von genetischen Faktoren an der Ätiologie von CED dokumentieren (Yang et al. 1993; Halme 2006). Über genomweite Assoziationsstudien (GWAS) sind bislang 163 sogenannte Risikogene entdeckt worden, wovon 30% in beiden Krankheitsformen vorkommen (Jostins et al. 2012). Zu den spezifischen MC-Risikogenen zählen zum Beispiel NOD2 und ATG16L1. Der NOD2-Locus konnte 2001 als erstes Risikogen beschrieben werden und korreliert positiv mit der Inzidenz an MC zu erkranken (Hugot et al. 2001; Ogura et al. 2001). Man unterscheidet dabei 3 Polymorphismen, wovon eine heterozygote Ausprägung mit einer 2-4-fachen und Homozygotie mit einer 20-40-fachen Steigerung an MC zu erkranken verbunden ist (Lesage et al. 2002). Generell können die genetischen Risikofaktoren unterschiedlichen funktionalen Bereichen wie dem angeborenen Immunsystem, Autophagie, Integrität der intestinalen Barriere, adaptive Immunantworten, Heilung und Reparatur von Gewebeschäden, Antworten auf oxidativen Stress, antimikrobieller Abwehr und Aktivität zugeordnet werden (Khor et al. 2011b). So zeigen beispielsweise *in vitro* Studien an primären humanen DCs (unreif) und Biopsien von MC-Patienten, dass DCs und Epithelzellen, die die genetischen Mutationen der NOD2 oder ATG16L1-Gene tragen einen Defekt in ihrer Funktion zur antibakteriellen Autophagie

besitzen. Mit dem Begriff Autophagie werden Mechanismen zur intrazellulären Homöostase benannt. So unterstützt Autophagie zum Beispiel die Degradierung und Wiederverwertung cytosolischer Inhaltsstoffe oder ganzer Organellen, aber auch Resistenz gegenüber intrazellulärer Infektionen und Beseitigung intrazellulärer Mikroben (Cooney et al. 2010).

1.3.1.4 Immunsystem

In der intestinale Lamina Propria befindet sich ein komplexes Netzwerk an unterschiedlichen Immunzellen, dessen Balance und Toleranz gegenüber harmlosen Bestandteilen des intestinalen Mikrobioms aber auch Widerstand gegenüber pathogenen Mikroorganismen vermittelt. Daher wird angenommen das CED die Konsequenz des Toleranzverlustes gegenüber der eigenen Mikroflora sein könnte (**Kap. 1.3.1.2**) (Mahida und Rolfe 2004). Kennzeichnend für eine aktive CED ist eine starke Infiltration der Lamina Propria mit Leukozyten (Bsp.: Neutrophile, Makrophagen, DCs, NK-Zellen, B und T-Zellen). Der erhöhte Aktivierungsstatus dieser Zellen induziert die Sekretion proinflammatorischer, zytotoxischer und lytischer Mediatoren und natürlich von Zytokinen als Botenstoffe, die eine erhöhte Apoptose von Enterozyten und letztlich die pathologischen Immunreaktionen induzieren (Guan und Zhang 2017). Neben vielen Faktoren die an der Entwicklung von CED beteiligt sein können, wird den CD4⁺ Effektor-T-Zellen eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie zugesprochen, da sie vielseitig auf die anderen Arme des intestinalen Immunsystems Einfluss nehmen. Dabei stimulieren vermutlich exogene Antigene ein IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 und TNF- α dominiertes Zytokin-Milieu und initiieren folgend die Dysbalance zwischen den immunregulatorischen Mechanismen, vermittelt maßgeblich von T_{regs} (Isaacs et al. 2005; Sanjabi et al. 2009). So zeigen MC-Patienten eine erhöhte Expression der T_{H1} Zytokine IFN- γ und IL-2, weswegen MC als T_{H1}-induzierte Erkrankung beschrieben wird (Breese et al. 1993). Die Sekretion von IFN- γ ist dabei wichtig, um Makrophagen zu aktivieren, wohingegen IL-2 wichtig für die Regulation T_{C1}-Zellen ist (Romagnani 1999). Im Gegensatz dazu wurde in KU-Patienten vornehmlich eine erhöhte Expression des Transkriptions-faktors GATA3 und die Sezernierung von IL-5 und IL-13 nachgewiesen, sodass KU als eine Erkrankung mit einem T_{H2}-ähnlichen Phänotyp beschrieben wird (Fuss et al. 1996; Fuss 2008). Dabei wird eine besondere Stellung von IL-13 als negativer Regulator der intestinalen Barriere über seine Apoptose-induzierende Wirkung auf IEZ, Induktion der Claudin-2 Expression und reduzierende Wundheilung, in der KU-Symptomatik

angenommen (Heller et al. 2005). Interessanterweise zeigten neue Studien während einer CED eine erhöhte Expression von Th17-Zytokinen (IL-17A, IL-17F, IL-21 und IL-22) in Kolon-Biopsien der Patienten, wodurch auf eine Schlüsselfunktion von Th17-Zellen bei der Ätiologie von CED geschlossen werden kann (Jiang et al. 2014; Olsen et al. 2011; Kobayashi et al. 2008; Rovedatti et al. 2009). Dabei konnte die genaue Funktion von Th17-Zellen in der Pathologie von CED bis heute nicht abschließend geklärt werden. So gibt es eine Vielzahl an Studien die einen pro-inflammatorischen Charakter dieser Effektor-T-Zellpopulation beschrieben, jedoch konträr dazu ebensolche die eine anti-inflammatorische Wirkung postulierten. So zeigten einige Studien eine Th17-vermittelte Expression pro-inflammatorischer Zytokine (z.B.: IL-6, IL-8, IL-1 β und TNF- α) und erhöhte Chemokin-Sekretion, gefolgt von einer zunehmenden Infiltration weiterer Immunzellen (Miossec 2007; Chen et al. 2013). Entgegen dieser Schlüsselparameter, die für den pro-inflammatorischen Charakter sprechen, konnte ebenso eine Th17-vermittelte Induktion der IL-22 Expression beschrieben werden, die den anti-inflammatorischen Charakter belegt (Kolls und Lindén 2004). Interessanterweise ist in den letzten Jahren deutlich geworden, dass die beschriebenen Effektor-T-Zellen keinen statischen, sondern einen dynamischen Charakter aufweisen. So können Th17-Zellen in Anwesenheit von IL-12 und IL-23 und Abwesenheit von TGF- β zu Th1-Zellen differenzieren (Annunziato et al. 2007) und auch umgekehrt Th1 in Th17-Zellen in Abhängigkeit von IL-6 und TGF- β differenzieren (Liu et al. 2015). Dieser Mechanismus könnte wiederum immensen Einfluss auf immunologische Prozesse (z.B.: CED) haben (Lee et al. 2009).

1.4 Mausmodelle zur Analyse von Erkrankungen des gastrointestinalen Traktes

Wie bereits beschrieben ist CED eine multifaktorielle Erkrankung, dessen genaue Ätiologie bis heute unklar ist. Auf Grund der steigenden Prävalenz von CED ist die genaue Erforschung der Mechanismen, die an der Entstehung und dem Fortlauf der Erkrankung beteiligt sind, dringend erforderlich, um neue Maßnahmen für eine erfolgreiche Therapie entwickeln zu können. In den letzten Jahren konnten diverse Mausmodelle zu enormen Fortschritten zum Verständnis des Krankheitsbildes beitragen (Mizoguchi 2012). Da für die vorliegende Arbeit ausschließlich im Infektionsmodell gearbeitet wurde, wird an dieser Stelle nur eine exemplarische Übersicht (**Tab. 1-1**) einiger bekannter Mausmodelle zur Untersuchung von CED

gezeigt. Die Zuordnung basiert auf den dominierenden immunologischen Profilen. Ferner sind die unterschiedlichen Untersuchungskriterien als Indizes angegeben. Des Weiteren ist zu erwähnen, dass eine Vielzahl der genetisch-transgenen oder Knock-Out Modelle in Kombination mit chemisch-induzierten oder infektions-induzierten Modellen Anwendung finden.

Tabelle 1-1: Auswahl an Mausmodellen zur biologischen Untersuchung von CED

Modell	Morbus Chron	Kolitis Ulcerosa	Referenzen
Chemisch			
	TNBS i.B.	DSS i.B. & Teff	(Okayasu et al. 1990; Neurath et al. 1995)
		Oxazolone i.B. & Teff	(Boirivant et al. 1998)
Genetisch (TG/KO)			
	SAMP1Y/Yit (Fc) s.C.	TCR $\alpha^{-/-}$ Teff	(Kosiewicz et al. 2001; Mizoguchi et al. 1996)
	TNF Δ ARE Teff	IL2 $^{-/-}$ reg.I. Teff	(Kontoyiannis et al. 1999; Willerford et al. 1995)
	N-Cadherin DN tg i.B.	Gai2 $^{-/-}$ reg.I. Teff	(Hermiston und Gordon 1995b; Rudolph et al. 1995)
	Muc1 $^{-/-}$ i.B.	Muc2 $^{-/-}$ i.B.	(Nishida et al. 2012; van der Sluis et al. 2006)
	C3H/HeJBir s.C.	IL-7 tg Teff	(Mähler et al. 1998; Watanabe et al. 1998)
	IL10 $^{-/-}$ s.C.	TRUC a.I.	(Berg et al. 1996; Garrett et al. 2007)

CD45RB^{high} into SCID or RAG^{-/-} reg.l. & Teff (Powrie et al. 1993)

Knochenmark in tgε26 reg.l. & Teff (Holländer et al. 1995)

i.B.: intestinale Barriere; a.l.: angeborene Immunreaktionen; Teff: massive Effektor T-Zellantworten; reg.l.: regulatorische Immunreaktionen; s.K.: spontane Kolitis; DSS: Dextran-Natrium-Sulfat; TNBS: Trinitrobenzonsulfonsäure. Verändert nach: (Valatas et al. 2015)

1.4.1 *Citrobacter rodentium*: Ein physiologisches Modell bakteriell-induzierter Kolitis

Neben den chemisch-induzierten Modellen zur Untersuchung von Erkrankungen des GI und im speziellen CED, gibt es nur wenige physiologische Modelle die zu einer stabilen Infektion und vor allem Kolonisierung des GI führen (Eckmann 2006). Zu den anerkanntesten Infektionsmodellen zählen *Salmonella typhimurium* (*Salmonella*) und *Citrobacter rodentium* (*C. rodentium*). Um eine stabile pathophysiologische Reaktion mit Hilfe von *Salmonella* zu induzieren ist, im Gegensatz zu *C. rodentium*, die Verwendung von Antibiotika (z.B.: Streptomycin, Kanamycin) vor der Infektion notwendig. Ein weiteres charakteristisches Merkmal einer *Salmonella* Infektion, im Gegensatz zu *C. rodentium* der eine lokale Infektion beschränkt auf das Kolon induziert, ist eine starke systemische Infektion, die häufig in einer Sepsis endet (Heffernan et al. 1987).

C. rodentium ist ein gram-negatives, nicht-invasives Mauspathogen, dessen Pathophysiologie erstmals von Brennan und Kollegen 1965 untersucht wurde und gehört zu der Familie darmpathogener *E. coli* (Brennan et al. 1965). Dazu zählen zum Beispiel EPEC und der enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) zu denen *C. rodentium* eine genetische Homologie von 67% aufweist (Petty et al. 2010). In Mäusen erfolgt die Infektion über die Faecal-Oral Route und induziert eine akute Darmentzündung (engl. *transmissible murine crypt hyperplasia*, TMCH) (Barthold et al. 1978). Die Kolonisierung des gastrointestinalen Traktes erfolgt über die Formierung sogenannter A/E-Läsionen (engl. *attaching and effacing lesions*) (David B. Schauerlt and Stanley Falkow 1993; Deng et al. 2003). Dieses charakteristische Merkmal beschreibt die Bindung von A/E-Pathogenen an das Epithel des Wirtes (engl. *attachment*) und Reorganisation des Aktin-Zytoskelettes (engl. *effacing*) zu Sockel-ähnlichen Ausstülpungen unterhalb der Bakterien (Wales et al. 2005). Die Fähigkeit

A/E-Läsionen auszubilden wird über die Expression der spezifischen LEE-Pathogenitätsinsel (engl. *Locus of Enterocyte Effacement*) vermittelt (McDaniel et al. 1995), in dem die genetischen Informationen für das Typ-III-Sekretionssystem, des Membranproteins Intimin und des Tir-Proteins (engl. *translocated intimin receptor*), sowie anderer Pathogenitätsfaktoren codiert werden (Deng et al. 2001; Deng et al. 2004).

Durch den losen Kontakt des Bakteriums mit der Membran des infizierten Enterozyten, erfolgt die Translokation des Tir-Elements über das Typ-III-Sekretionssystem in die Zellmembran und induziert über die Bindung an Intimin die genannte Reorganisation der Aktin-Filamente im intestinalen Epithel (Lai et al. 2013).

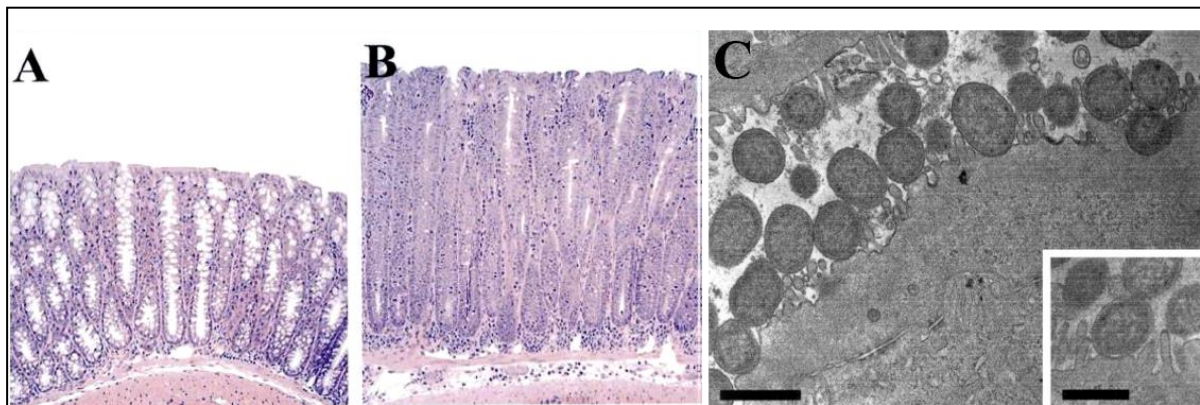


Abbildung 1-9: *C. rodentium*-induzierte TMCH. **A)** H&E Färbung des gesunden Kolons **B)** H&E Färbung von einem infizierten Kolon mit Kryptenhyperplasie und Goblet-Zell-Depletion **C)** A/E Läsionen mit den charakteristischen Sockel-ähnlichen Strukturen während einer *C. rodentium* Infektion. Übernommen aus (Luperchio und Schauer 2001; Luperchio et al. 2000)

Die Infektion von immunkompetenten Mäusen mit *C. rodentium* ist normalerweise selbstlimitierend. Kennzeichnend sind eine geringe Morbidität (Gewichtsverlust und Diarrhoe) und Mortalität, wobei jedoch, je nach verwendetem Mausstamm, erhebliche Anzeichen einer TMCH induziert werden können. Allgemein erfolgt eine Kolonisierung limitiert auf das distale Kolon, mit einer geringen systemischen Ausbreitung der Bakterien (Bry und Brenner 2004a). Nach der initialen Kolonisierung des Blinddarms (Caecums), genauer dem Caecalen-Patch, können 1-3 Tage nach der Infektion (engl. *post-infection*, p.i.) erste Bakterien im distalen Kolon nachgewiesen werden (Wiles et al. 2004). Die maximale Kolonisierung (*Peak-Infektion*) wird in den meisten Mausstämmen 7-10 Tage p.i. erreicht (Eckmann 2006). Zu diesem Zeitpunkt können bis zu 10^9 *C. rodentium* Bakterien im Kolon gefunden werden. Insgesamt ist eine Infektion mit *C. rodentium* nach drei bis vier Wochen in immunkompetenten Mäusen überwunden, so dass keine Bakterien über den Stuhl nachweisbar sind (engl.

Clearance) (Mundy et al. 2005). Neben der charakteristischen Krypthyperplasie und der verdickten Mukosa, durch die folglich ein verkürztes Kolon resultiert, ist eine Depletion der Goblet-Zellen, Infiltration von Immunzellen in das Kolon und Caecum, kennzeichnend für eine *C. rodentium* induzierte TMCH (Luperchio und Schauer 2001). Studien des Infektionsverlaufes zeigten, dass die physiologischen Veränderungen der Kolon-Architektur gemessen anhand des Verhältnisses von Kolongewicht-zur Länge 5 Tage nach der Infektion messbar werden, 2 Wochen nach der Infektion ihr Maximum erreichen und nach 3 Wochen beginnen abzuklingen (d.h. nach der *Clearance*) (Koroleva et al. 2015). Nach einer Infektion mit *C. rodentium* sind die Mäuse gegenüber einer zweiten Infektion resistent (Maaser et al. 2004a).

Wissenschaftliche Arbeiten der letzten Jahrzehnte konnten neue Erkenntnisse in die immunologische Regulation einer *C. rodentium* induzierten TMCH geben und lassen auf ein komplexes Zusammenspiel zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem, ähnlich den bisher bekannten Entwicklungen während CED, schließen (vgl. **Kap.1.3**) (Higgins et al. 1999). Allgemein akzeptiert ist, dass *C. rodentium* eine CD4⁺ T-Zell-vermittelte Immunantwort induziert, charakterisiert durch eine zunehmende Expression von IFN- γ , IL-12, und TNF- α (Th1 Zellen) aber auch IL-21 und IL-17 (Th17- Zellen). So zeigten sowohl CD4^{-/-} als auch IFN- γ ^{-/-}-defiziente Mäuse eine stärkere Pathologie, gefolgt von einer höheren systemischen Ausbreitung von *C. rodentium*, durch die eine Funktion von CD4⁺ T-Helferzellen in der Abwehr (engl. *Clearance*) angenommen werden kann (Higgins et al. 2009). Neben CD4⁺ T-Zellen konnte gezeigt werden, dass auch B-Zellen immunregulatorische Funktionen übernehmen. So führte eine passive Immunisierung von CD4^{-/-}-defizienten Tieren mit IgG Antikörpern zu einer Reduktion der *C. rodentium* induzierten Gewebeschädigungen (Maaser et al. 2004b). Neben den adaptiven Mechanismen resultiert eine *C. rodentium* Infektion in Störungen der intestinalen Permeabilität, die zu einer Translokation der Bakterien in die Lamina Propria, dem Interaktionspunkt mit dem Immunsystem des Wirtes, führt. Studien konnten dies in Einklang mit einer erhöhten Aktivität der Wnt/ β -Catenin, Notch und NF κ B-Signalwege bringen (Ahmed et al. 2012). Auf Grund der genannten Eigenschaften einer *C. rodentium* Infektion, eignet sich dieser Modellorganismus, nicht nur zur Analyse von Wirts-Pathogen Interaktionen, sondern auch um detaillierte Einblicke in die Mechanismen von intestinalen Entzündungsreaktionen, Heilungsprozessen an mukosalen Oberflächen und Regulationsmechanismen der kommensalen Mikrobiota zu erhalten, die wiederum zu

neuen Erkenntnissen vor allem im Hinblick auf Erkrankungen wie CED, und Kolonkarzinomen führen können (Higgins et al. 2014).

2 Zielsetzung

Die Mitglieder der CEA-Familie sind vielfach in diversen Krebserkrankungen beschrieben worden und finden bis heute als Tumormarker Verwendung. Aktuelle Studien zeigen eine erhöhte Expression von CEACAM1 sowohl auf transkriptioneller als auch auf Protein-Ebene im Kolon von CED-Patienten. Allerdings ist die Funktion von CEACAM1 in diesem Zusammenhang noch unklar. Daher sind weitergehende wissenschaftliche Analysen bezüglich der Funktion von CEACAM1 notwendig und eröffnen möglicherweise Blickwinkel, die zur Entwicklung neuer therapeutischer Maßnahmen von CED beitragen könnten.

Ziel dieser Arbeit ist es daher die Rolle von CEACAM1 bei einer bakteriell-induzierten Kolitis zu untersuchen. Dazu soll das Mausmodell der *C. rodentium* induzierten Kolitis verwendet werden. Auf Grund der starken Expression von CEACAM1 auf intestinalen Epithelzellen und deren Funktion als physikalische Barriere zur Abwehr von exogenen Pathogenen, soll in einem ersten Teil der Arbeit der Einfluss von CEACAM1 in diesem Zusammenhang analysiert werden.

Des Weiteren wird CEACAM1 von einem Großteil der Immunzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems exprimiert, wodurch eine immunmodulatorische Funktion von CEACAM1 angenommen wird. Daher soll im zweiten Teil der Arbeit die Frage beantwortet werden, ob und in wie weit sich die Expression von CEACAM1 auf Immunzellen bzw. den Verlauf der bakteriell-induzierten Kolitis auswirkt.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 3-1: Verwendete Chemikalien und Lösungen

Chemikalie	Hersteller	Bestellnr.
LE Agarose	Biozym GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland	840004
AutoMACS Pro Washing Solution	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-092- 987
AutoMACS Runnung Buffer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-091- 221
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	B 7651
Collagenase Typ IV	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	C5138-5G
Desoxynukleosid Triphosphate (je 100 µmol/ml)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	10297-018
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, Deutschland	A994.2
Deoxyribonuclease (DNase) I	Quiagen, Hilden, Deutschland	79254
Ethidiumbromidlösung 1 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland	2218.2
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland	8043.2
Ethylenglycol-bis- (aminoethylether)-tetraessigsäure (EGTA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland	3054.2
Ethanol absolut und vergällt	Roth, Karlsruhe, Deutschland	9065.4; T171.3
Fötale Kälber/Bovine Serum (FCS/FBS)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland	S 0115
FACS Flow Sheath Fluid	BD Biosciences, Heidelberg	342003
FACS Clean Solution	BD Biosciences, Heidelberg	340345
FACS Rinse Solution	BD Biosciences, Heidelberg	340346
Fluorescein isothiocyanate- dextran	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	46944
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland	4043.1
Ionomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	I 0634-1MG

Kaliumchlorid [KCl]	Roth, Karlsruhe, Deutschland	HN02.1
Kaliumhydrogencarbonat [KHCO ₃]	Roth, Karlsruhe, Deutschland	P748.1
Kaliumhydrogenphosphat [KH ₂ PO ₄]	Roth, Karlsruhe, Deutschland	3904.2
Lipopolysaccacharid (LPS)	InvivoGen, San Diego, USA	tlrl-eblps
Magnesiumchlorid [MgCl ₂]	Roth, Karlsruhe, Deutschland	2189.2
Monensin (1000x)	eBioscience, San Diego, USA	00-4505-51
Natriumchlorid [NaCl]	Roth, Karlsruhe, Deutschland	3957.1
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland	0335.2
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	P 1585-1MG
Trypanblau 0,4 %	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	15250061
Tissue-Tek®C.C.T.IM compound	Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Niederlande	4583

3.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3-2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Einmalspritzen (2ml, 10ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Keramik Spheren	MP Biomedicine, USA
Kulturplatten (6,12,24,48,96 Well)	Greiner BioOne
MacConkey Selektionsplatten	Oxoid, Deutschland
Mikroschraubröhre (2ml)	MP Biomedicine, USA
Mikrotiterplatten (Schwarz)	Greiner BioOne
Pipettenspitzen	Thermo Scientific, Sarstedt, Biozym
PP-Röhrchen	Greiner BioOne
Reagenzröhrchen (15 und 50 ml)	Greiner BioOne
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Sarstedt
Reaktionsgefäße farbig (0,6 ml)	Biozym Scientific GmbH
Rundbodenplatten (96 well)	Greiner BioOne
Zellsiebe (70, 50 und 40 µm)	Falcon

3.3 Puffer

Erythrozyten-Lysis-Puffer	155 mM NH_4Cl
(ACK- Puffer)	9, 98 mM KHCO_3
	0, 5 M EDTA, pH = 8
	pH auf einen Bereich zwischen
	7,2 - 7,4 einstellen, dann steril filtrieren
FACS-Puffer	1x PBS- Puffer
	2% (v/v) hitzeinaktiviertes FCS
	2 mM EDTA
PBS-Puffer 1x	8 g/l NaCl (Natriumchlorid)
	2 g/l KCl (Kaliumchlorid)
	1, 44 g/l Na_2HPO_4 (Dinatriumhydrogenphosphat)
	0,2 g/l KH_2PO_4 (Kaliumhydrogenphosphat)
	pH = 7
PBS/ EDTA	1x PBS Puffer
	3 mM EDTA
TE-Puffer	10mM Tris/ HCl (pH = 8)
	1 mM EDTA in MilliQ Wasser
TBE-Puffer	89 mM $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ (Tris)
	89 mM H_3BO_3 (Borsäure)
	2,53 mM EDTA

3.4 Zellkulturmedien

RPMI1640 Komplettmedium	RPMI 1640 mit GlutaMAX™ und 25mM HEPES 10 % hitzeinaktiviertes FCS 100 µg/ml Streptomycin 100 U/ml Penicillin 2 mM L-Glutamin
IMDM-Komplettmedium	IMDM mit GlutaMAX™ und 25 mM HEPES 10 % hitzeinaktiviertes FCS 100 µg/ml Streptomycin 100 U/ml Penicillin 25 µM β-Mercaptoethanol
RPMI/ FCS	RPMI 1640 mit GlutaMAX™ und 25mM HEPES 20% FCS
RPMI/ FCS/ EGTA/ MgCl ₂	RPMI 1640 mit GlutaMAX™ und 25mM HEPES 1%FCS 1 mM EGTA 1, 5 mM MgCl ₂
LB-Medium	20 g/l LB- Broth- Base 4,5 g/l NaCl Destiliertes Wasser pH = 7,5
LB-Agar	LB-Medium versetzt mit 15 g/l Agar

3.5 Kommerzielle Kits und Reagenzien

Tabelle 3-3: Verwendete Kits und Reagenzien

Kit	Hersteller	Bestellnummer
CD4+ T cell isolation kit, mouse	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-104-454
CD8+ T cell isolation kit, mouse	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-104-075
CFSE: Vybrant CFDA-SE Cell Tracer Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	V 12883
Foxp3 Staining Buffer Set	eBioscience, San Diego, USA	00-5523-00
Fluoromount-GTM	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Tor, Deutschland	00-4958-02
Gene ruler 100 bp ladder Plus	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Tor, Deutschland	SM0322
Go Taq Hot Start Polymerase	Promega, Mannheim, Deutschland	M5005
M-MLV Reverse Transkriptase, RNase H Minus Point Mutant	Promega, Mannheim, Deutschland	M3682
RNeasy Tissue Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland	74704
SYBR Green	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Tor, Deutschland	K0252
Tissue-Tek® O.C.TTM	Sakura Finetek, Leiden, Holland	4583

3.6 Primer

Alle benannten Oligonukleotide wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Firma Eurofins Genomics bezogen.

Tabelle 3-4: Verwendete Primer

Oligonukleotid	Sequenz	Annealing Temperatur (TA)
RPS9 5'	CTGGACGAGGGCAAGATGAAGC	50- 60 °C
RPS9 3'	TGACGTTGGCGGATGAGCACA	

Cox-43 5'	CTGCCTTTCGCTGTAACACT	58 °C
Cox-43 3'	CGCTCAAGCTGAACCCATA	
Claudin-3 5'	GCGGGAGATGGGAGCTGGGTTGTA	58 °C
Claudin-3 3'	GTGGATCGCGGCGCAGAATAGAGG	
Defa5 5'	AGGCTGATCCTATCCACAAAACAG	58 °C
Defa5 3'	TGAAGAGCAGACCCTTCTTGGC	
E-Cadherin 5'	CACCTGGAGAGAGGCCATGT	60 °C
E-Cadherin 3'	TGGGAAACATGAGCAGCTCT	
Occludin 5'	GCCCTGGCTGACCTAGAACTTAC	55 °C
Occludin 3'	AGACTTAGCCAAAACCTGCCTTAGC	
ZO-1 5'	TTTTTGACAGGGGGAGTGG	52 °C
ZO-1 3'	TGCTGCAGAGGTCAAAGTTCAAG	
ZO-2 5'	CTAGACCCCCAGAGCCCCAGAAA	58 °C
ZO-2 3'	TCGCAGGAGTCCACGCATACAAG	

3.7 Antikörper und Fluorochrome

Die folgenden Tabellen 3-5 und 3-6 benennen alle Fluorochrome und Antikörper, die für *in vivo* und *in vitro* Applikationen und der durchflusszytometrischen Analyse von Einzellellsuspensionen verwendet wurden.

Tabelle 3-5: Verwendete Fluorochrome

Fluorochrom	Abkürzung	Max. Extinktion	Max. Emmision
Allophycocyanin	APC	650	660
Allophycocyanin- Cyanin 7	APC-Cy7	633	780
Brilliant Violet 510	BV510	405	510
Carboxyfluorescein succinimidyl ester	CFSE	492	517
Fluoresceinisoithiocyanat	FITC	494	519
mRuby		558	605
Pacific Blue	PB	401	452
Peridinin-chlorophyll- Cyanin- 5.5	PerCP-Cy5.5	490	695

Phycoerythrin	PE	496	578
Phycoerythrin-Cyanine 7	Pe-Cy7	496	786

Tabelle 3-6: Verwendete Antikörper

Antikörper	Fluorochrom	Klon	Hersteller	Bestellnummer
CD3e	ungekoppelt	145-2C11	BD	553058
CD3e	PE	145-2C11	BD	553311
CD4	PB	RM4-5	BD	558107
CD4	APC	RM4-5	BD	553051
CD8	PB	53-6.7	BD	558106
CD8	BV510	53-6.7	BD	560778
CD8	<i>in vivo</i> mAb	YTS169.4	BioXCell, West- Libanon	BE0117
CD62L	Pe-Cy5	MEL-14	eBioscience	15-0621-82
CD69	Biotin	H1.2F3	BD	553235
CEACAM1	APC	MAb-CC1	BD	134510
CEACAM1	FITC		B.B. Singer	
<i>Citrobacter koseri</i>	ungekoppelt		Abcam, Cambridge, UK	ab37056
CTLA-4	PE	UC10-4F10-11	BD	553720
FoxP3	PerCP-Cy5.5	FJK-16s	eBioscience	45-5773-82
GrzB	AF647	GB11	Thermo Fisher	MHGB05
IFN-γ	FITC	XMG1.2	eBioscience	562019
IL-17A	BV421	TC11-18H10.1	BioLegend	505009
Ki-67	Pe-Cy7	SolA15	eBioscience	25-5698-80
PD-1	Pe-Cy7	RPM1-30	BioLegend	48-0302-80
Streptavidin	PE		BD	554061

3.8 Geräte

Tabelle 3-7: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
7500 Fast Real-Time PCR System	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
autoMACS® Pro Separator	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Binokular Axiovert 40C	Zeiss
Durchflusszytometer BD LSR II	BD Biosciences, Heidelberg
Fast Prep®-24	MPTM
GelDoc Station	INTAS®
Gellaufkammer Horizon 11.14	Whatman Inc., USA
Heracell 150i CO ₂ - Inkubator	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
Heraeus Multifuge 3SR+	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
Luminex Technology AtheNA Multy-Lyte	Progen, Heidelberg, Deutschland
Magnetrührer Variomag	Pady Technology
Nanodrop Photometer	peqLab
Neubauer Zählkammer (0,0025 mm ²)	Superior, Marienfeld, Deutschland
TriStar2 Microplate reader	Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Deutschland
Präzisionswaage	Shimadzu Corporation
Sicherheitswerkbank Msc Advantage	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf
Vortexer	Neo Lab
Wasserbad	GFL

3.9 Bakterien

In dieser Arbeit wurde mit dem *Citrobacter rodentium* Stamm ICC169, zur Verfügung gestellt von PD. Dr. Christian Riedel der Universität Ulm, gearbeitet. ICC169 ist ein Derivat des Stammes ICC168 (Barthold et al. 1978), der im Gegensatz zu diesem bei gleichbleibender Pathogenität über eine spontane Nalidixin Resistenz verfügt (R. Mundy und G. Frankel, unpublizierte Daten).

3.10 Mausstämme

Die unterschiedlichen Mausstämme die in dieser Arbeit verwendet wurden sind auf C57Bl/6 Hintergrund gezüchtet worden. Die Haltung erfolgte unter pathogenfreien Konditionen in individuell belüfteten (IVC2) Käfigen mit einem Maximalbesatz von fünf Tieren pro Käfig. Zu Beginn der einzelnen Analysen waren die Tiere mindestens 6 Wochen alt. Die Infektionen mit *Citrobacter rodentium* erfolgten in einem Haltungsraum der Sicherheitsstufe S2. Alle Experimente wurden gemäß den geltenden Tierschutzrichtlinien, genehmigt durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW (LANUV) in Recklinghausen, durchgeführt.

3.10.1 Ceacam1^{-/-} oder auch 2D2

Ceacam1^{-/-} Mäuse wurden durch die freundliche Unterstützung und Kooperation mit der AG von Herrn Dr. rer. nat. B.B. Singer und der AG von Herrn Prof. Dr. med. K.S. Lang für dieses Projekt zur Verfügung gestellt.

3.10.2 C57Bl/6J

Der Stamm C57Bl/6J wurde aus dem Zuchtbestand der Harlan Laboratorien in den Niederlanden bezogen und diente als Referenzgruppe, im Folgenden als Wildtyp (WT) bezeichnet.

3.11 Zellbiologische Methoden

3.11.1 Allgemeine Kulturbedingungen von Einzelzellsuspensionen

Zur späteren Analyse der immunologischen Konstitution, hauptsächlich mit Hilfe durchflusszytometrischer Messungen wurden Lymphozyten der Milz, mesenterischen Lymphknoten und Lamina propria, wie im Folgenden beschrieben, gewonnen. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Organe nach der Dissektion bis zum Ende des

Präparationsvorganges in geeigneten Zellkulturplatten, befüllt mit kaltem 1X PBS auf Eis, aufbewahrt. Die Zellkultur erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in einem CO₂-begasbaren Inkubator bei einer Temperatur von 37 °C, einer rel. Luftfeuchtigkeit von 95 % und einem CO₂-Gehalt von 5 %.

3.11.1.1 Isolierung von Splenozyten

Um Splenozyten zu isolieren wurde eine Petrischale mit ca. 1 ml ACK-Puffer und einem 70 µm Zellsieb vorbereitet. Die Milz konnte dann mit einem sterilen Stempel einer 2 ml Spritze durch das Zellsieb gedrückt und anschließend, nach Zugabe von FACS-Puffer, bei 1200 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Die Pufferlösung konnte anschließend abgesaugt und das Zellpellet in einer adäquaten Menge IMDM-Komplettmedium (IMDM_c-Medium) resuspendiert werden.

3.11.1.2 Zellisolierung aus den mesenterialen Lymphknoten

Die vier das Kolon drainierenden mesenterialen Lymphknoten (mLN) befinden sich in einem Faszienetz zwischen Dick- und Dünndarm. Sie sind gut von dem umgebenden Gewebe anhand ihrer leicht gelben Farbe und ihrer Konsistenz unterscheidbar.

Nach der Präparation wurden die mLNs auch hier in eine Petrischale überführt, mit dem Stempel einer 2 ml Spritze vorsichtig durch das 70 µm Zellsieb passiert und bei 1200 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, konnten die Zellen in einem Volumen von 1 ml IMDM_c-Medium resuspendiert werden.

3.11.1.3 Isolierung von Lamina propria Lymphozyten

Vor der Isolierung der Lymphozyten der Lamina propria (LPLs) wurden alle verwendeten Puffer und Lösungen in einem Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt. Nachdem die Nahrungsreste mit eisgekühltem PBS aus dem Kolon gespült wurden, erfolgte anschließend die longitudinale Öffnung des Kolons. Daraufhin wurde das Kolon in ca. 1 cm große Stücke geschnitten und in ein mit ca. 40- 60 ml 1x PBS/EDTA-Puffer befülltes, Becherglas überführt. Dieser Arbeitsschritt wurde nach 10-minütiger Inkubation in einem CO₂-Inkubator wiederholt.

Im Anschluss wurden die Gewebereste mit ca. 15 ml des RPMI/FCS/EGTA/MgCl₂-Puffers bedeckt und für 15 Minuten erneut im CO₂-Inkubator auf dem Magnetrührer inkubiert. Dieser Schritt erfolgte ebenfalls in einer Wiederholung. Im Anschluss an den zweiten Waschschrift wurde der Überstand durch ein 70 µm Zellsieb dekantiert und

die Gewebestücke in einem 50 ml Reaktionsgefäß, in dem sich bereits 10 ml des vorgewärmten RPMI/FCS/EGTA/MgCl₂-Puffers befanden, überführt. Folgend wurde das darin befindliche Gewebe für eine kurze Zeit auf einem Vortexer durchmischt und die Flüssigkeit erneut durch einen 70 µm Zellsieb dekantiert. Das so im Filter aufgefangene Gewebe wurde mit eiskühlem 1x PBS gewaschen und dann zurück in die Bechergläser überführt. Für den anschließenden Verdau musste das Gewebe in möglichst kleine Stücke zerkleinert werden, damit die Collagenase IV, erreicht über eine große Oberfläche, möglichst effizient arbeiten konnte. Bedeckt wurden die feinen Gewebestücke mit genau 15 ml RPMI Medium, dem 20%-ig FCS beigesetzt war. Der Verdau konnte dann nach der Zugabe von 250 µl Collagenase IV im CO₂-Inkubator auf dem Magnetrührer für 1 h vollzogen werden. Um die Effizienz zu steigern, wurde bereits nach einer halben Stunde das Gewebe mit Hilfe einer 10 ml Einmalspritze mehrmals auf- und abgezogen, dabei dient dieser Schritt einer höheren Ausbeute an LPLs. Nach Beendigung des einstündigen Verdauprozesses wurde der eben beschriebene Vorgang wiederholt, die gesamte Flüssigkeit, inklusive der Gewebestücke, durch ein 40 µm Zellsieb passiert und die Lösung in einem 50 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Nach der Zentrifugation (s.o.) konnten die isolierten LPLs schließlich in einem Gesamtvolumen von 1,5 ml IMDM- Medium resuspendiert, gezählt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis verwahrt werden.

3.11.2 Isolierung von CD8⁺ T-Zellen mittels magnetischer Zellsortierung (MACS)

Die Isolierung von definierten Zellpopulationen über die MACS Technologie hat sich in den letzten Jahren in zahlreichen wissenschaftlichen Studien etabliert und wurde auch in der vorliegenden Arbeit angewandt.

Das Prinzip bei der CD8⁺ T-Zellisolierung ist eine indirekte Markierung. Das bedeutet, dass alle Zellen die nicht den „*Cluster of Differentiation*“ Faktor (CD) 8 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, von einem biotinylierten Antikörpermisch gebunden und in einem zweiten Schritt an „*Anti-Micro Beads*“ gekoppelt werden. Die folgende Zellsortierung über ein starkes magnetisches Feld sortiert die unmarkierten CD8⁺ T- Zellen in die Negativfraktion, sodass sie dort angereichert vorliegen.

Nach der Isolation der Milzzellen wie in **Kap. 3.11.1.1** beschrieben, wurde das autoMACS[®] Separationssystem und das CD8⁺ *T cell isolation kit* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland), spezifisch für den Mausorganismus, nach

Herstellerangaben verwendet. Im Anschluss an die Separation wurden die Zellen für 10 Minuten bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert und in 2 ml IMDM_c-Medium aufgenommen.

3.11.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS, *Fluorescence activated cell scanning*) ist seit 1968 eine patentierte Methode zur Analyse der physikalischen Eigenschaften von Einzelzellsuspensionen und findet Einsatz vor allem in der Immunologie, Infektionsbiologie und Hämatologie. Das Besondere an diesem Verfahren ist, dass simultan und mit hoher Durchsatzrate mehrere Eigenschaften eukaryotischer Zellen untersucht werden können. Die Analyse beruht auf der Messung der Emission von Streu- und Fluoreszenzlicht von Einzelzellsuspensionen. Zellen die über einen fluoreszierenden monoklonalen Antikörper, spezifisch für unterschiedliche Moleküle, markiert wurden passieren in einem laminaren Hüllstrom einen Laserstrahl geeigneter Wellenlänge, werden angeregt und anhand der Emission des Fluoreszenz- und Streulichtes anschließend in ihrer quantitativen Zusammensetzung analysiert. Neben unterschiedlichen Lasern die spezifische Fluorochrome in einem definierten Wellenlängenbereich anregen, finden unterschiedliche Bandpassfilter Verwendung, um die Auswahl einsetzbarer Fluorochrome weiter zu erhöhen. Die so erhaltenen Signale werden dann zu einem Detektor (meist Photomultiplier zur Signalverstärkung) geleitet und können anschließend über die Umwandlung von elektrischen Strömen hin zu digitalen Signalen, mit Hilfe der Herstellersoftware in einem Histogramm, Punkte- oder Dichtediagramm am Computer dargestellt und ausgewertet werden (Valery V. Tuchin, 2011).

3.11.3.1 Oberflächenfärbung von Proteinen

Die wie in **Kap. 3.11.1** beschrieben isolierten Einzelzellsuspensionen wurden in einem definierten Volumen in eine 96-Loch Rundbodenplatte (Greiner, bio-one) überführt und einer Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 Minuten unterzogen. Der Überstand wurde anschließend verworfen. Die Fluorochrom-markierten Antikörper wurden in FACS-Puffer verdünnt (s. h. **Tab. 3-5** und **3-6**) und in einem Volumen von 100 µl pro Kavität auf die Zellen pipettiert. Die Zellen wurden dann für 10 Minuten bei 4°C in Dunkelheit aufbewahrt. In dieser Zeit binden die Antikörper an ihre spezifischen Epitope auf der Zelloberfläche. Über die Zugabe von 100 µl FACS-Puffer wurde die Reaktion abgestoppt und nach erneuter Zentrifugation (s.o.) konnte die überschüssige

Antikörperlösung verworfen werden. In dieser Arbeit wurden alle so oberflächlich gefärbten Proteine abschließend mit 2%-igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Dazu wurden die Zellen in 100 µl von 2%-igem PFA eluiert und für 10 Minuten bei 4°C in Dunkelheit inkubiert. Nach Beendigung der Fixierung wurden 100 µl des FACS-Puffers hinzugegeben, die Zellen (s.o.) zentrifugiert und in einem Volumen von 150 µl FACS-Puffer eluiert. Nach dem Überführen in geeignete PP-Reaktionsgefäße (Greiner BiOne) konnten die durchflusszytometrischen Analysen durchgeführt werden.

3.11.3.2 Intrazelluläre Färbung von Proteinen

Um im Anschluss einer Oberflächenfärbung intrazelluläre Proteine zu färben wurde diese durch die Zugabe von 100 µl PBS abgestoppt und die Zellen nach der Zentrifugation (s.o.) mit 200 µl PBS gewaschen. Zur folgenden Fixierung wurde das „FoxP3 staining Buffer Set“ von eBioscience nach Herstellerangaben verwendet und erfolgte, wenn nicht anders angegeben, für 1,5 h bei 4°C in Dunkelheit. Die so permeabilisierten Zellen wurden mit 1x Permeabilisierungspuffer (eBioscience) gewaschen und folgend in 100 µl der Antikörpersuspension resuspendiert. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten (FoxP3) bzw. 1 Stunde (GrzB und Ki-67) bei 4°C oder RT in Dunkelheit. Nach erneutem Waschen mit 1x Permeabilisierungspuffer konnten die Zellen in 150 µl FACS-Puffer für die durchflusszytometrische Analyse resuspendiert werden.

3.11.3.3 Intrazelluläre Färbung von IL-17A und IFN-γ

Für die durchflusszytometrische Analyse der intrazellulären Zytokine IL-17A und IFN-γ wurden die entsprechenden Zellsuspensionen in einem Volumen von 200 µl pro Kavität in eine 96-Loch Rundbodenplatte pipettiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation, während der das IMDMc-Medium mit 5 µg/ml Brefeldin-A (BFA), 10 ng/ml Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), 1 µg/ml Ionomycin, und 1 µg/ml Monensin angereichert wurde. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen in einem Volumen von 200 µl des genannten Stimulationsmediums resuspendiert und für 4 Stunden im CO₂-Inkubator restimuliert. Im Anschluss wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und die Oberflächenfärbung (**Kap. 3.11.3.1**), sowie die intrazelluläre Färbung (**Kap. 3.11.3.2**) durchgeführt. Die intrazelluläre Färbung von IFN-γ und IL-17A erfolgte für 30 Minuten bei 4°C in Dunkelheit.

3.11.4 CFSE Markierung von CD8⁺ T-Zellen

Um die Proliferation von aufgereinigten CD8⁺ T-Zellen zu analysieren, wurden die Zellen mit dem Carboxyfluorescein-Diactetat Succinimidyl-Ester (CFDA-SE, kurz: CFSE) markiert. Das farblose nicht-fluoreszierende CFSE, kann durch seine hohe Zellpermeabilität, passiv in Zellen jeglicher Organe und Spezifitäten diffundieren. Innerhalb der Zelle wird dann über die Spaltung seiner Acetat-Gruppe (durch intrazelluläre Esterasen) und der kovalenten Bindung an Amine (über seine Succinimidyl-Estergruppe) ein starkes Fluoreszenzsignal generiert, dass proportional zur Zellteilung an Intensität verliert. CFSE bietet den Vorteil einer zuverlässigen Analyse von Zellteilungsprozessen bis hin zu 8 Zellteilungszyklen hinweg. Auf Grund seiner stabilen intrazellulären Bindung werden die biologischen Zellfunktionen nicht beeinträchtigt. Die Zellen wurden nach der magnetischen Separation (**Kap. 3.11.2**) in IMDM-Medium ohne Zusätze gewaschen und dann in 4 ml frischem IMDM-Medium aufgenommen und mit 2,5 µM CFSE für 8 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Zugabe von 4 ml vorgewärmten FCS und erneuter Inkubation für 5 Minuten bei 37°C, wurden die Zellen abschließend mit 4 ml PBS verdünnt. Danach erfolgte eine Zentrifugation und die Zellen konnten in 1 ml IMDM-Komplettmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt werden (vergl. **Kap. 3.11.6**).

3.11.5 *In vitro* Analyse der PD-1 Expression und Proliferation von CD8⁺ T-Zellen

Zur Vorbereitung der Kultivierung von Zellsuspensionen zur Analyse der Proliferation und der PD-1 Expression *in vitro* wurden die 96-Well Flachbodenplatten mit 0,75 µg/ml des unmarkierten anti-CD3 Antikörpers beschichtet und für 1,5 h bei 37°C inkubiert. Nachdem überschüssiger Antikörper über zweimaliges Waschen mit PBS abgetragen wurde, konnten 2,5x10⁵ Zellen pro Kavität, in Duplikaten, überführt werden. Dabei wurden ebenfalls unstimulierte sowie Zellen ohne PD-1 bzw. CFSE-Markierung als Kontrollen eingesetzt. Anschließend konnten die Zellen *in vitro* über einen Zeitraum von 3 Tagen, gelöst in einem Volumen von 200 µl IMDM_c-Medium pro Kavität bei 37°C in einem CO₂-Inkubator stimuliert werden. Nach 24 h Stunden wurden die jeweiligen Zellen in eine 96-Loch Rundbodenplatte überführt und die Zellkulturüberstände für die Analyse des Zytokin-Profiles nach einer Zentrifugation abgenommen. In diesem Zuge erfolgte auch die Oberflächenfärbung für PD-1 und die der CFSE-markierten Proben, (vgl. **Kap. 3.11.3.1**). Nach der Markierung mit den Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern

wurden die CFSE-markierten Proben direkt durchflusszytometrisch in Ihrem unfixierten Zustand analysiert, wohingegen die PD-1 Messung an fixierten Zellen durchgeführt wurde.

3.11.6 Bestimmung von Zellzahlen

Für die Bestimmung der Zellzahlen wurde eine Neubauer-Zählkammer mit 10-15 µl der Zellsuspensionen (s. **Kap. 3.11.1**) verdünnt in Trypanblau beladen. Die Berechnung der Gesamtzellzahl in einem definierten Volumen erfolgte, indem die Zellzahlen mit dem Volumen der Zellsuspensionen, dem Verdünnungsfaktor in Trypanblau und dem Kammerfaktor der Neubauer-Zählkammer (10^4) multipliziert wurden. Ebenso konnten die absoluten Zellzahlen einer definierten Zellpopulation über die Multiplikation der Gesamtzellzahl mit dem prozentualen Anteil der Zellpopulation dividiert durch 100 berechnet werden.

3.11.7 Kultivierung von Kolon-Biopsien

Nach erfolgter Präparation des Kolons (vergl. **Kap. 3.11.1.3**) und longitudinaler Öffnung wurden ca. 0,2 x 0,2 mm² große Biopsien aus dem rektalen Bereich entnommen. Nach anschließender Bestimmung des Gewichtes an einer Feinwaage (im Mittel ~ 0,2-0,5 mg) wurden die Biopsien in eine 48-Loch Kulturplatte, in der 350 µl IMDM_c-Medium vorgelegt waren, überführt und für 6 h Stunden in einem CO₂-Inkubator inkubiert. Um Verunreinigungen und Gewebereste zu sedimentieren erfolgte eine Zentrifugation der Überstände bei 8000 g für 10 Minuten in 1,5 ml Reaktionsgefäßen. Im Anschluss konnten die Überstände in saubere Reaktionsgefäße überführt und bis zu weiteren Analyse bei -80°C aufbewahrt werden.

3.11.8 Quantifizierung sezernierter Zytokine

Die Quantifizierung sekretierter Zytokine von Zellkulturüberständen oder Serumproben, die bis zur Analyse bei -80°C gelagert wurden, erfolgte über das Luminex AtheNA Multy-Lyte System. Mit diesem System konnten unter Verwendung der „*Procarta Cytokine Assay Kits*“ (Panomics, Fremont, USA) nach Herstellerangaben, parallel mehrere Zytokine (in der vorliegenden Arbeit 9-plex) analysiert werden. Die einzelnen Zytokin-Konzentrationen wurden über die Luminex IS Software (Luminex Corporation, Austin, USA) bestimmt.

3.12 Molekularbiologische Methoden

3.12.1 Kultivierung von *Citrobacter rodentium* aus der Stammhaltung

Die Kultur von *Citrobacter rodentium* erfolgte aus Glycerin-Krystocks, die bei -80°C zur Langzeitlagerung aufbewahrt wurden. Die Krystocks wurden über die Zugabe steriler Glycerin-Lösung (87% (w/v)) zu der LB-Flüssigkultur von *C. rodentium* (Verhältnis 1:1) generiert. Von dieser Bakteriensuspension wurden 50 µl mit Hilfe einer Impfschlinge auf einer LB-Agar Platte ausgestrichen und ÜN in einem CO₂-Inkubator bei 37°C für die Kurzzeitaufbewahrung (max. 1 Woche bei 4°C) bebrütet. Für die ÜN-Flüssigkultur wurden 200 ml LB-Flüssigmedium mit einer Mischkultur von *C. rodentium* versetzt. Die Kultivierung in einem 500 ml Erlenmeyer-Kolben erfolgte bei 37°C und 180 rpm für 16-20 h, sodass sich die Bakterien zum Infektionszeitpunkt in der stationären Wachstumsphase befanden. Da die Bakterien ohne den Zusatz von Antibiotika angezüchtet wurden, mussten parallel zur Anzucht im LB-Flüssigmedium Testplatten der Mischkulturen angelegt werden, um Verunreinigungen ausschließen zu können. Dafür wurden sechs 1,5 ml Reaktionsgefäße sterilem PBS (RT) vorbereitet und mit einem Abstrich der *C. rodentium* LB-Agar Platte versetzt. Nachfolgend wurden 1/10 Verdünnungen bis 10⁻⁶ vorgenommen und 100 µl der Verdünnungen 10⁻⁵ und 10⁻⁶ auf MacConkey Agar Platten ausplattiert und ÜN bebrütet. Waren die Kulturen rein, konnte mit der Vorbereitung für die Infektion (vergl. **Kap. 3.13.1**) begonnen werden.

3.12.2 RNA- Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus den Kolon-Biopsien ~0,2 mg, die in 300 µl RLT-Lysis Puffer bei -20°C gelagert wurden, erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben. Am Ende der Isolation wurde die Gesamt-RNA in einem Volumen von 30 µl eluiert und bis zur Durchführung der cDNA Einzelstrangsynthese (s. **Kap. 3.12.4**) bei -80°C aufbewahrt.

3.12.3 Spektrophotometrische Quantifizierung von Ribonukleinsäuren

Mit dem Nanodrop-Photometer des Herstellers peqLab Biotechnologie erfolgte die Konzentrationsbestimmung von Ribonukleinsäuren (RNA). Dabei wurden 1,5 µl der jeweiligen Probe auf das Auftragsfenster pipettiert und dem ultravioletten Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm ausgesetzt. Nukleinsäuren (DNA und RNA) weisen bei

dieser Wellenlänge ein Absorptionsmaximum auf, welches zur Konzentrationsbestimmung genutzt werden kann.

Die Überlagerung der Absorption von Nukleinsäuren bei 260 nm und von Proteinen bei 280 nm wird zur Bestimmung des Reinheitsgrades der Probe genutzt und zeigt an, wie stark die Probe durch Alkohole oder Proteinreste verunreinigt ist. Weist der Quotient E260/E280 einen Wert von ~ 2 auf, wird von einer reinen RNA-Isolierung gesprochen.

3.12.4 cDNA Erststrangsynthese

Nach der in **Kapitel 3.12.2** beschriebenen RNA-Isolation, kann durch die Verwendung einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase), eine RNA-Matrize in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Die so generierte cDNA diente folgend als Grundlage der in **Kapitel 3.12.7** beschriebenen Genexpressionsanalysen über die quantitativen Real-Time PCR.

Die cDNA-Synthese beginnt mit einer initialen Denaturierung für 10 Minuten bei 70°C im Thermocycler. Dazu wurde der folgende Ansatz verwendet.

- 0,5 µg RNA-Template in RNase-freiem H₂O gelöst
- 0,5 µl Oligo(dT)
- 0,5 µl Random Primer

Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt und 6 µl des Master-Mixes, in dem die Reverse Transkriptase enthalten war auf die Reaktionsgefäße verteilt.

Master-Mix:

- 4 µl 5 x M-MLV-Reverse Transkriptase-Puffer
- 1 µl 10 µM dNTP-Mix
- 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase

Die Inkubation der Reverse-Transkriptase Reaktion erfolgte für 1h bei 42°C, die folgend durch eine 5-minütige Inkubation bei 90°C inaktiviert wurde. Die so generierte cDNA konnte dann in 1,5 ml Reaktionsgefäße transferiert und entweder direkt für die Semi-quantitative RPS9-PCR verwendet oder bei 20°C gelagert werden.

3.12.5 Semi-quantitative RPS9-PCR

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können enzymatisch von bestimmten Nucleotidsequenzen *in vitro* millionenfach Kopien hergestellt (amplifiziert) werden. Dabei wurde stets nach der „Hot start“ Methode verfahren. Diese dient der Vermeidung von Artefakten durch unspezifische Primer-Bindungen oder Primer-Dimere, da die Polymerisation erst beginnen kann, wenn der Oligonukleotidprimer spezifisch an die gewünschte DNA-Sequenz gebunden hat. In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Verwendung der HotStartTaq-DNA-Polymerase ein automatischer *hot start* erfolgen, d.h. alle PCR-Komponenten konnten bei Raumtemperatur gemischt werden, da diese in einem inaktivierten Zustand vorliegt und erst durch die initiale Aufheizphase des Thermocyclers aktiviert wird.

Wie üblich wird nach der initialen Denaturierung die PCR in drei Abschnitte gegliedert, welche zusammen einen Zyklus ergeben. Beginnend mit einem kurzen Denaturierungsschritt, gefolgt vom Anlagern der Primer (engl., Annealing) und schließlich mit einem Elongationsschritt endend. Die Denaturierung findet bei 95°C statt, so dass sich der Doppelstrang der Template-DNA auftrennt. Anschließend wird die Temperatur, abhängig von dem jeweiligen Primerpaar, herunterreguliert. Da hier die Überprüfung der einzusetzenden cDNA-Templatmenge über das Housekeeping Gen RPS9 erfolgte lag diese stets bei 58°C.

Für den Elongationsschritt wird die Temperatur dann wieder auf 72°C heraufgesetzt, da diese optimal für die Taq-Polymerase ist. Nach 30 Zyklen findet die finale Elongation statt, welche sicherstellt, dass keine Einzelstränge im Applifikat enthalten sind. Bis zur anschließenden Gel-Elektrophorese wird die Temperatur dann auf 4°C heruntergefahren.

Zusammensetzung für ein Reaktionsvolumen von 20 µl:

- 1 µl cDNA Template
- 4 µl GoTaq Reaktionspufferr
- 0,4 µl (10 µM) dNTP Mix
- 1,2 µl (10 mM) MgCl₂
- 1 µl RPS9 Primer Mix (je 5 µl 5' und 3' Primer in 90 µl H₂O_{dest})
- 12,3 µl H₂O_{dest}
- 0,1 µl GoTaq Polymerase

Tabelle 3-8: Programm der Semi-quantitativen PCR

		30 Zyklen				Stop
Temperatur	95°C	95	58°C	72°C	72°C	4°C
Zeit [mm:ss]	10:00	00:45	00:45	01:00	10:00	unbegrenzt

3.12.6 Agarosegel-Elektrophorese

Mit Hilfe von Agarose als Trägermatrix können geladene Fragmente (DNA oder RNA) größenabhängig im elektrischen Feld getrennt werden. Nukleinsäuren, die bekanntlich negativ geladen sind, wandern daher bei angelegter Spannung von der Anode zur Kathode. Die Agarose übernimmt die Funktion eines Molekularsiebes, so dass die Wanderungsgeschwindigkeit abhängig von der Molekülgröße bzw. dem Molekulargewicht der aufzutrennenden Stoffe ist. Dementsprechend wandern kleinere Moleküle schneller durch die Trägermatrix als größere.

Verwendet wurde eine Agarosekonzentration von 1% (w/v) gelöst in 1xTBE Puffer, das der Auftrennung von 0,5-7kb Fragmenten dient. Die Elektrophorese erfolgte bei einer angelegten Spannung von 150 V und wurde anschließend an der Gel-Doc Station visualisiert und photographisch dokumentiert.

3.12.7 Quantitative *Real-Time* PCR

In der vorliegenden Arbeit wurde die *Real-Time* PCR (RT-PCR) nach dem Zweischnitt Verfahren durchgeführt, das bedeutet zuerst wurde das RNA Template wie in **Kap. 3.12.4** erläutert in komplementäre DNA transkribiert und wurde Eingangs für die hier beschriebene RT-PCR verwendet. Der Vorteil dieses Vorgehens ist, dass in beiden Reaktionen die Bedingungen optimal auf die jeweils verwendeten Enzyme abgestimmt werden können. Zudem kann eine große Anzahl an Transkripten aus einer einzigen cDNA-Synthese generiert werden.

Die Erfassung der amplifizierten PCR-Produkte erfolgte über eine Markierung durch den DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green, der sich mit hoher Spezifität zwischen kleinen Furchen der doppelsträngigen DNA einlagern kann, woraus ein detektierbares Fluoreszenzsignal generiert wird. Das bedeutet das Fluoreszenzsignal wird in jedem Reaktionszyklus detektiert und ist proportional zur Menge des gebildeten

PCR-Produktes. Der Rückschluss auf die so gebildete Menge der eingesetzten Zielnukleinsäure erfolgte über eine relative Quantifizierung. Dabei kann über das Verhältnis der Zielsequenz zu einer Referenzsequenz (*housekeeping*-Gen RPS9) die relative Änderung der Genexpression abgeleitet werden. Die Ziel- und Referenztranskripte wurden aus der gleichen Nukleinsäureprobe in getrennten Reaktionen amplifiziert und anschließend die Mengen der endogenen Referenz mit der des zu untersuchenden Transkriptes in Bezug zueinander gesetzt. Voraussetzung bei dieser Methode war die gleichbleibende Genexpression des *housekeeping*-Gens RPS9 bei unterschiedlichen experimentellen Bedingungen, z.B. beim Vergleich von gesundem mit erkranktem Gewebe.

Reaktionsansatz für die quantitativen Real-Time PCR:

- ~20 ng cDNA-Template
- 1 x SYBR Green PCR Master Mix
- 50-900 nM Vorwärtsprimer
- 50-900 nM Rückwärtsprimer
- mit RNase freiem H₂O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl einstellen

Die Fluoreszenzsignale wurden mit dem 7500 Fast Real-Time PCR System detektiert und anschließend mit Hilfe der „7500 Fast Real-Time System-Software“ analysiert.

Tabelle 3-9: Real-Time PCR Programm

		40 Zyklen			Dissoziationskurve		
Temperatur	94°C	94	T _A	72°C	95°C	60°C	95°C
Zeit [mm:ss]	10:00	00:15	00:30	00:30	00:15	01:00	00:15

3.13 Tierexperimentelle Methoden

3.13.1 Induktion einer bakteriellen Kolitis mit *Citrobacter rodentium*

Für die Induktion einer bakteriellen Kolitis wurde *C. rodentium* in einer Flüssigkultur, wie in **Kap. 3.12.1**, beschrieben vermehrt. Nach der Wachstumsphase ÜN erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen LB-Flüssigmedium als Leerwert. Für die orale Applikation wurden Kulturen mit einer OD

zwischen 0,78-0,83 verwendet. Um Mäuse auf C57Bl/6J Hintergrund zuverlässig mit $2-5 \times 10^9$ Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) zu infizieren wurden 3 ml pro Tier nach einer Zentrifugation bei 4000 rpm für 10 Minuten in einem Volumen von 100 µl in PBS resuspendiert. Für eine genaue Bestimmung der Infektionsdosis wurde die Bakterien-suspension parallel seriell 1/10 in PBS verdünnt und 100 µl auf MacConkey Selektionsplatten ausplattiert, ÜN bei 37°C inkubiert und am folgenden Tag die Kolonien ausgezählt.

Die Infektion der Mäuse erfolgte über eine orale Gavage der vorbereiteten Bakterien-Suspension direkt in den Magen der Mäuse. Dafür wurden die Tiere fixiert, der Kopf überstreckt und die Kanüle vorsichtig platziert. Die physiologische Konstitution der Versuchstiere wurde vor der Infektion und während des gesamten Versuchszeitraumes anhand ihres Körpergewichtes und der Erscheinung beobachtet. Um den Infektionsverlauf analysieren zu können wurden in regelmäßigen Abständen (Tag 3, 5, 7 und 10 nach der Infektion) Faeces-Proben entnommen, gewogen, homogenisiert und seriell in PBS verdünnt. Die Verdünnungen 10^{-2} - 10^{-6} wurden wie oben beschrieben auf MacConkey Selektionsplatten ausplattiert und inkubiert. Am folgenden Tag konnten dann die Kolonien ausgezählt und die KBE berechnet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Analysezeitpunkte, 5 und 10 Tage nach der Infektion (engl. *post infection*, p.i.), gewählt (**Abb. 3-1**). Am jeweiligen Analysetag wurden die restlichen makroskopischen Parameter, wie z.B. die Länge und das Kolon- und Milzgewicht, die KBE der Organe und Faeces bestimmt.

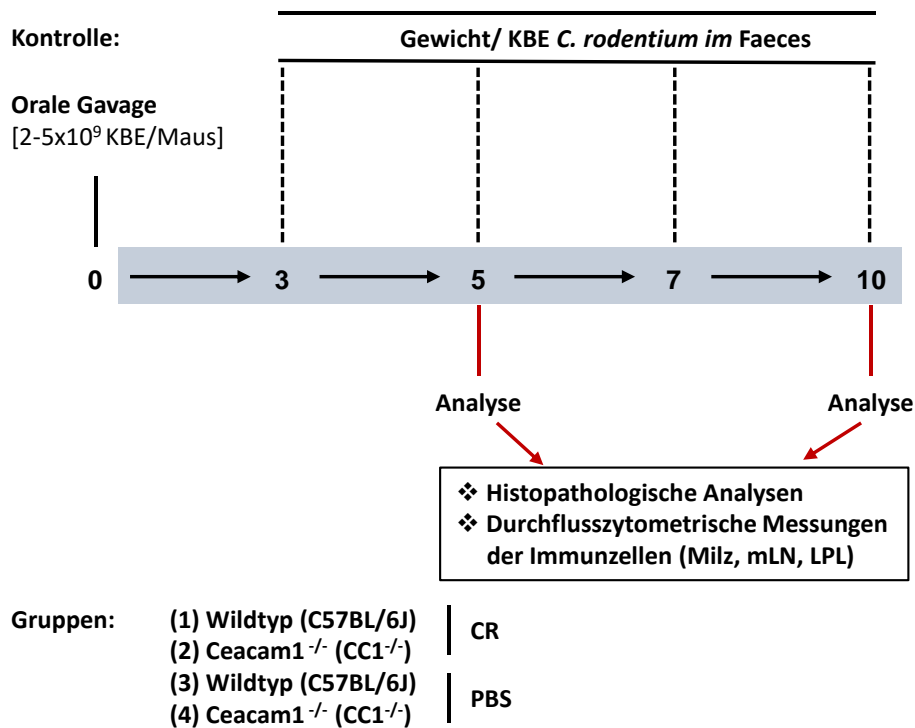


Abbildung 3-1: Schematischer Aufbau der Versuchsdurchführung einer *C. rodentium* induzierten Kolitis. Nach der Infektion wurden die Tiere, wie anhand der gestrichelten Linien markiert, gewogen und die bakterielle Last im Faeces analysiert. Die roten Pfeile geben die 2 Analysezeitpunkte an. Die Gruppenverteilung ist mit den Nummern (1) - (4) angegeben.

3.13.2 Depletion von CD8⁺ T-Lymphozyten

Um den Einfluss von CD8⁺ T-Lymphozyten während einer bakteriell-induzierten Kolitis zu untersuchen, wurde ein neutralisierender CD8 Antikörper, bezogen von der Firma BioXcell (Klon YTS169.4), in einer Konzentration von 250 µg/200 µl je Versuchstier intraperitoneal (i.p.) appliziert. Die Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper wurde bereits 2 Tage vor der Infektion (**Kap. 3.13.1**) begonnen und während der Infektion an den Tagen 3 und 7 wiederholt um eine Depletion der CD8⁺ T-Zellen über den gesamten Versuchszeitraum zu erreichen (**Abb. 3-2**).

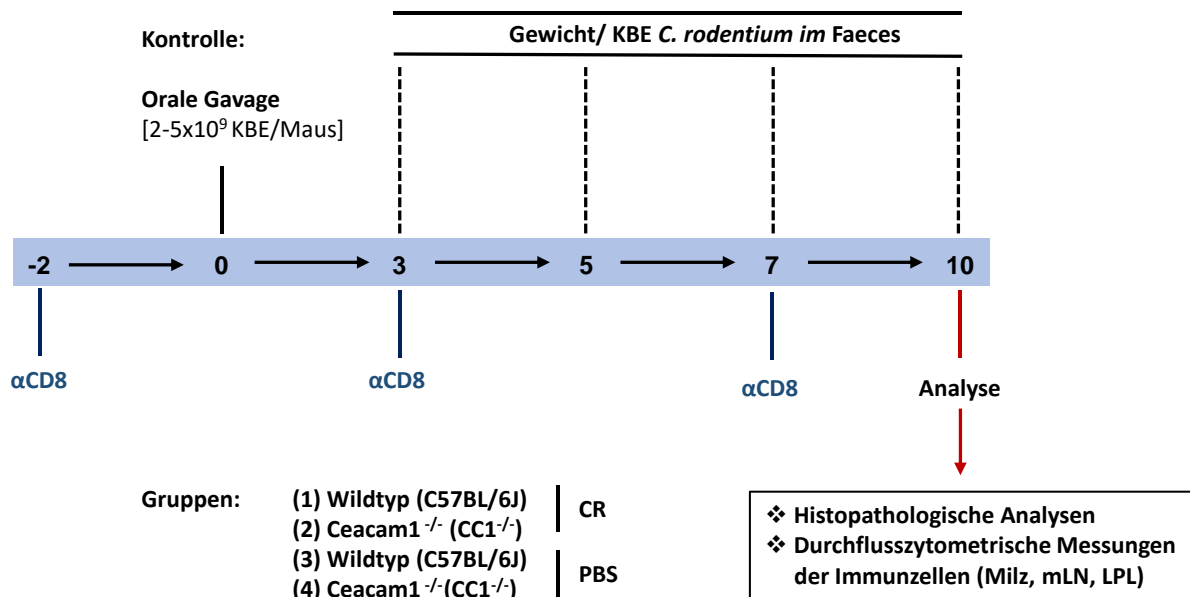


Abbildung 3-2: Schema der Depletion von CD8⁺ T-Zellen. Vor der Infektion wurden die Tiere mit dem neutralisierenden Antikörper i.p. behandelt. Nach der Infektion wurden die Tiere gewogen und die bakterielle Last im Faeces bestimmt (gestrichelte Linien). Des Weiteren wurde der mAk-αCD8 zwei weitere Male i.p. appliziert um eine Depletion der CD8⁺ T-Zellen während des gesamten Versuchszeitraumes zu gewährleisten. Die Untersuchung in den angegebenen Gruppen (1) -(4) wurden wie eingezeichnet 10 Tage nach der Infektion durchgeführt.

3.13.3 Generierung von Knochenmark-Chimären

Die Generierung der für diese Arbeit verwendeten Knochenmarkchimären erfolgte durch die freundliche Unterstützung des wissenschaftlichen Mitarbeiters Vishal Khairnar im Rahmen der Kooperation zwischen der Arbeitsgruppe (AG) von Herrn Prof. Dr. K. S. Lang nach etabliertem, laboreigenem Protokoll. Bevor mit der eigentlichen Transplantation des Knochenmarks (KM) begonnen werden konnte wurden die einzelnen Empfängertiere einer letalen Bestrahlung von 1024 Rad ausgesetzt, um eine biologische Nische für das Spender-KM zu schaffen. Das Spender-KM wurde nach der zervikalen Dislokation der Spendertiere (*Ceacam1*^{-/-} bzw. C57BL/6J (WT)) aus den *Tibiae* und *Femura* der Tiere gewonnen. Um ein möglichst reines KM isolieren zu können, wurden die Knochen zunächst von allen Muskel-oder Geweberesten befreit und anschließend 2 Min. in Ethanol und folgend PBS inkubiert, um die Knochen zu säubern. Danach wurden die so präparierten Knochen vorsichtig an beiden Enden geöffnet und das KM, mit einer Spritze, gefüllt mit Zellkulturmedium, aus dem Knochen gespült. Die gewonnenen Zellen wurden anschließend mit ZK-Medium gewaschen und über Zentrifugation (s.o.) pelletiert. Für die Rekonstitution der bestrahlten Tiere wurde das KM in einem geeigneten Volumen ZK-Medium resuspendiert, um davon jedem Versuchstier 200 µl des jeweiligen KMs i.v. zu

injizieren. Innerhalb der ersten Woche entschied sich dann, ob die Tiere das Spender-KM erfolgreich angenommen haben.

3.13.4 Membranpermeabilitätsassay

Die intestinale Barriere dient der Abwehr von endogenen Pathogenen und Toxinen die sich im Lumen des gastrointestinalen Traktes befinden. Durch eine Störung der intestinalen Homöostase kann der Verlust einer separierten Umgebung schwerwiegende Gewebeschäden und Immunreaktionen induzieren (*Sun et al. 1998*). Die Analyse der intestinalen Permeabilität ist daher ein wichtiger Parameter für die zu Grunde liegende Arbeit im Modell der *C. rodentium* induzierten Kolitis (**Kap. 3.13.1**). Um diesen Parameter zu bestimmen wurden Fluorescein-gekoppelte Dextran beads (Fitc-Dextran Beads) eingesetzt. Charakteristisch für Dextran als Trägersubstanz ist eine geringe Toxizität, gute Wasserlöslichkeit und auf Grund seiner chemischen Zusammensetzung kann es von den meisten endogenen Glycosidasen nicht gespalten werden. Ferner ist Dextran ein relativ inertes Molekül, wodurch Wechselwirkungen mit dem Organismus nahezu ausgeschlossen werden können und sich daher besonders für *in vivo* Applikationen eignet (*Schroder 1976*). Dabei können neben Permeabilitätsmessungen von Epithelbarrieren ebenfalls Strömungsanalysen von Gefäßsystemen oder auch Internalisierungsanalysen über Phagozytose und Endozytose untersucht werden (*Oliver et al. 1984; Huang et al. 2011*).

Um die intestinale Permeabilität analysieren zu können, wurden Fitc-Dextran Beads in einer molekularen Größe von 4 kDa (FD-4) gewählt und in einer Konzentration von 0,1 g/ml gelöst in PBS über eine orale Gavage in den Mausorganismus verabreicht (*Gupta und Nebreda 2014*). Damit valide Resultate erzielt werden konnten wurde diese Applikation in einem zeitlichen Abstand von 15 Min. zwischen den einzelnen Versuchstieren durchgeführt. Die zeitliche Differenz dient der Euthanasie der Tiere, um für alle Versuchstiere die gleichen Ausgangsparameter zu schaffen. Ferner wurde nach der oralen Applikation der FD-4 Beads das Futter aus den Käfigen entnommen, damit die Tätigkeit des gastrointestinalen Traktes nicht durch eine weitere Nahrungsaufnahme belastet wurde. Nach der Entnahme des Blutes der mit Isofluran narkotisierten Versuchstiere und Überführung in ein Reaktionsgefäß (1,5 ml) wurden die Versuchstiere über eine zervikale Dislokation erlöst und die Dissektion der Organe folgte. Neben den Gruppen von Interesse musste an dieser Stelle auch das Serum eines unbehandelten Tieres gewonnen werden, um den Hintergrund des

unbehandelten Serums berücksichtigen zu können. Die Proben wurden, bis von allen Versuchstieren gewonnen, auf Eis und Dunkel gelagert, um die Stabilität der FD-4 Beads zu gewährleisten. Um das Serum zu gewinnen wurden die Reaktionsgefäße bei 1500 g für 10 Min. zentrifugiert, wonach das Serum aus der oberen Phase mit einer Pipette abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Auch hieran wurde anschließend auf eine dunkle und kühle Lagerung bei 4°C geachtet.

Für die Analyse wurden 100 µl der 1/10 in PBS verdünnten Serumproben in eine 96-Loch Mikrotiterplatte mit schwarzem Rand überführt. Um die Konzentration der FD-4 Beads im Serum mit einem Spektrophotometer zu analysieren, musste von der Ausgangslösung eine serielle Verdünnung für eine Standardkurve hergestellt werden. Die FD-4 Ausgangslösung wurde für diesen Zweck von 1000 µg/ml bis hin zu 0 µg/ml seriell in PBS verdünnt und in Triplikaten in die Mikrotiterplatte überführt. Abschließend konnte die Messung, bei einer Extinktion von 485 nm und einer Emission von 535 nm, erfolgen. Die so detektierten Signale des Fluorecins sind proportional zur Permeabilität des gastrointestinalen Traktes (vergl. **Abb. 3-3**).

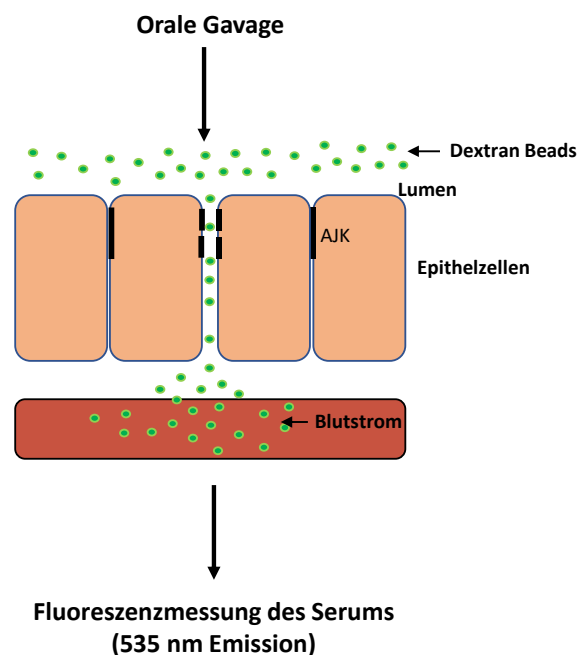


Abbildung 3-3: Versuchsprinzip zur Quantifizierung der intestinalen Permeabilität. FD4-beads wurden über orale Gavage in den GI der Versuchstiere appliziert. Bei einer durchlässigen intestinalen Barriere können die 4kDa großen Moleküle die intestinale Barriere durchdringen und in das Blutkreislaufsystem gelangen. Über eine spektrophotometrische Fluoreszenzmessung kann die Konzentration an FD-4 beads [µg/ml] als Maß der intestinalen Permeabilität bestimmt werden.

3.14 Histologische Untersuchungen

3.14.1 Histopathologische Untersuchung des Kolons

Nach der Präparation und Spülung mit PBS wurde das gesamte Kolon auf histologischen Kassetten aufgewickelt und in 4%-igem PFA fixiert. Die folgenden histologischen Arbeiten (Paraffinschnitte, H&E Färbung) und deren Beurteilung wurden an dem Institut für Veterinärpathologie der Freien Universität zu Berlin von Prof. Dr. Robert Klopffleisch, im Rahmen einer Kooperation, vorgenommen. Für eine genaue Beurteilung des Entzündungsgrades wurden verschiedene Parameter, wie die Entzündungszellinfiltration, Epithelschädigung, Depletion der Goblet-Zellen, Infiltration von Neutrophilen, Kryptabzesse und Krypthyperplasie, über ein numerisches Punktesystem von 0-3 bewertet. Zusätzlich wurden die Längen der Krypten im distalen Bereich des Kolons vermessen. Für die graphische Auswertung und Darstellung wurden ausschließlich die Parameter aus dem rektalen Bereich des Kolons für die Arbeit verwendet, da sich dort die Pathologie, induziert durch eine Infektion mit *C. rodentium*, manifestiert.

3.14.2 Immunohistochemische Färbung von Kolon-Präparaten

Für eine Immunohistochemische Analyse der CEACAM1 Expression wurde der rektale Bereich (~1 cm Länge) in Tissue-Tek eingebettet und bis zur Herstellung der Gefrierdünnschnitte (5-7 µm) bei -80°C aufbewahrt. Die Immunohistochemischen Färbungen wurden über die freundliche Kooperation mit der wissenschaftlichen Mitarbeiterin Frau Verena Schmitt der AG Dr. rer. nat. B. B. Singer am Universitätsklinikum Essen, nach dem laboreigenen Standardprotokoll, durchgeführt. Die Schnitte wurden zuerst über Aceton/Ethanol fixiert und anschließend mit 1%-igem BSA/PBS blockiert. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem spezifischen amsCC1-Antikörper gelöst in 0,5% BSA/PBS für 60 Min. in einer feuchten Kammer in Dunkelheit. Nach wiederholtem Waschen mit 1xPBS konnten die Gefrierdünnschnitte dann in Fluoromount G eingebettet werden. Die immunhistochemischen Aufnahmen erfolgten anschließend an einem Zeiss Laser-Scanning Mikroskop. Für die CEACAM1 Färbung wurde ein Fluorescein-markierter anti-CEACAM1 Antikörper (amsCC1-FITC), in Kombination mit DAPI verwendet. Dabei eignet sich DAPI zur Visualisierung der Nuclei, da es an doppelsträngige DNA-Bereiche binden kann. Zur Visualisierung der Infektion mit *C. rodentium* wurde ein spezifischer Antikörper gegen den Stamm

Citrobacter in Kombination mit dem Sekundärantikörper mRuby für die immunhistochemischen Aufnahmen verwendet (vgl. **Tab. 3-6**).

3.15 Software und Statistik

Für die Analysen der Durchflusszytometrischen Messungen wurde die BD FACS Diva-Software (8.0.1) verwendet. Die Erstellung der Graphen und Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte über die Graph Pad Prism-Software (Version 7, LaJolla, USA). Für eine genaue Bewertung der Messwerte wurden zum einen der Student's t-Test oder der One-Way ANOVA mit folgender Bonferroni-Korrektur verwendet. Als statistisch signifikant sind $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***) definiert und in den Graphen, wie angegeben, dargestellt. Die Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit der Microscope Imaging Software von Leica (Wetzlar, Deutschland) generiert und ausgewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von CEACAM1 auf eine bakteriell-induzierte Kolitis

CEACAM1 ist von besonderem wissenschaftlichem Interesse, da über alternative Splicing-Prozesse eine Vielzahl von Homologen in 27 unterschiedlichen Wirbeltiergruppen entstanden sind. Während im humanen Organismus 12 Isoformen von CEACAM1 bekannt sind, konnten in der Maus 4 detektiert werden (Zebhauser et al. 2005). Studien zeigen für CEACAM1 ein überaus beeindruckendes Expressionsprofil im menschlichen sowie murinen Organismus. So konnte eine Expression von CEACAM1 u.a. in unterschiedlichen Epithelien und Endothelien, aber auch auf Zellen des Immunsystems wie NK-Zellen, Granulozyten, Monozyten, DCs, T- und B-Zellen nachgewiesen werden (Watt et al. 1991; Muenzner et al. 2000; Möller et al. 1996; Khan et al. 1993; Öbrink 1997). In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass CEACAM1 auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird und eine natürliche Funktion als co-inhibitorischer Rezeptor durch die Expression zweier ITIM-Motive in seiner cytoplasmatischen Domäne besitzt (vgl. **Abb. 1-7**) (Möller et al. 1996; Donda et al. 2000). Daher sind funktionelle Studien über CEACAM1 von großem Interesse für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze bei immunopathologischen Prozessen, wie zum Beispiel chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen (CED).

4.1.1 Analyse der CEACAM1 Expression im Kolon

Um den Einfluss von CEACAM1 auf eine bakteriell-induzierte Kolitis zu untersuchen, wurde zunächst mit der Validierung der CEACAM1 Expression in C57BL/6J Wildtyp-Mäusen (WT) begonnen. Dazu wurde die grundsätzliche Expression von CEACAM1 im rektalen Kolon über eine quantitative RT-PCR nachgewiesen (**Abb. 4-1, A**). Anschließend wurden Antikörper-Färbungen gegen CEACAM1 an Gefrierdünn-schnitten des rektalen Kolons durchgeführt. Die fluoreszenzmikroskopischen Analysen zeigen eine deutliche Expression von CEACAM1 auf der apikalen Oberfläche des rektalen Kolonepithels, die teilweise bis tief in die Krypten reicht (**Abb. 4-1, B**; dreieckige Markierungen). In weitergehenden durchflusszytometrischen Analysen der Zellen der Lamina propria des Kolons konnte gezeigt werden, dass ein kleiner prozentualer Anteil von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen CEACAM1 auf ihrer Oberfläche exprimieren (**Abb. 4-1, C**).

Zusammenfassend zeigen diese initialen Experimente eine konstitutive Expression des CEACAM1-Moleküles im Epithel des Kolons, sowie auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und bestätigen die Studien von Leung et al. und Zalzal et al. (Leung et al. 2006b; Zalzal et al. 2008)

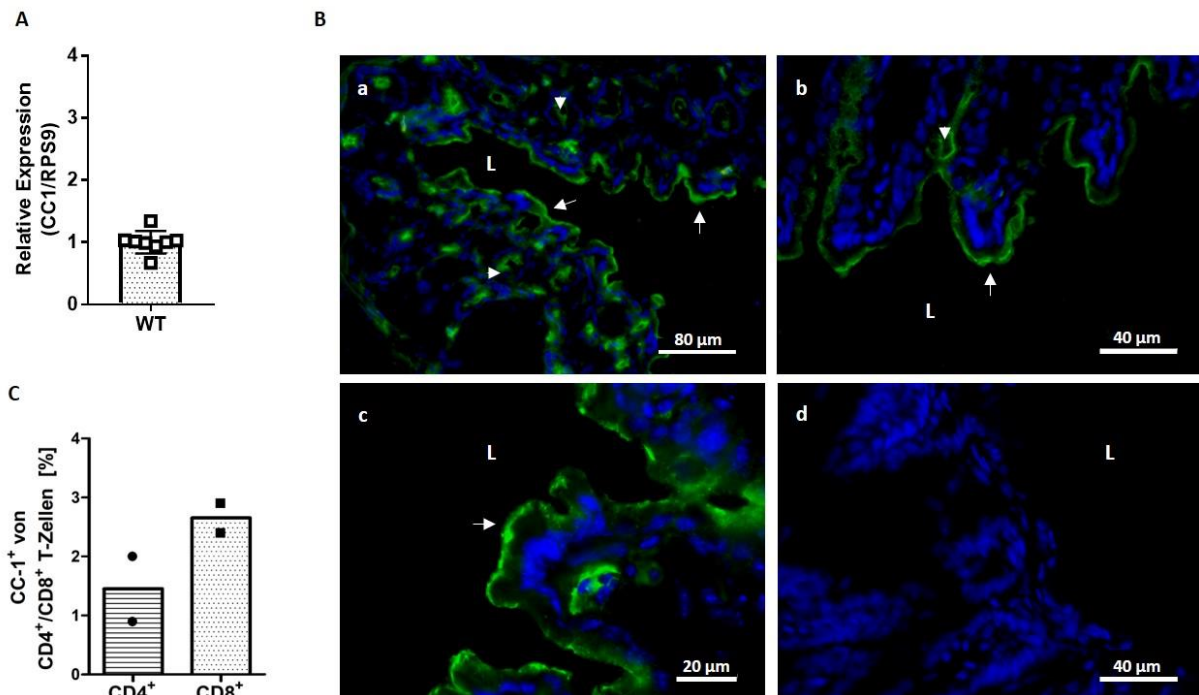


Abbildung 4-1: Lokalisation der CEACAM1 Expression im Kolon von naiven WT-Mäusen. **A)** Nach der Präparation wurden Kolon-Biopsien entnommen, RNA isoliert und über eine quantitative RT-PCR die relative Expression von CC1 analysiert (n=8) **B)** **a)** 20x Vergrößerung. **b)** 40x Vergrößerung. **c)** 63x Vergrößerung. Gefriedünnschnitte im Querschnitt (5 µm) des rektalen Kolon-Bereiches gesunder WT-Mäuse. Die Schnitte wurden mit einem monoklonalen Antikörper (mAb) αmsCC1 gefärbt und mit einem Alexa488 Sekundärantikörper behandelt. Zusätzlich sind die Nuclei über die Färbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) abgebildet. Die CEACAM1-Exression (grün) zeigt in unterschiedlichen Vergrößerungen eine beständige Expression im apikalen Bereich der Krypten (↑), bis hin zur Krypt-Basis (Δ). **d)** Primärantikörperkontrolle ohne αmsCC1 gefärbt. Dargestellt ist ein exemplarisches Resultat von drei unabhängigen Präparationen. **C)** Durchflusszytometrische Charakterisierung der CC1 Expression im Grundzustand auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (n=2) aus einem individuellen Experiment. Im Balkendiagramm sind die Mittelwerte als ± SEM angegeben. **CC1:** CEACAM1; **WT:** Wildtyp

Um zu testen, ob eine bakteriell-induzierte Kolitis einen Einfluss auf die Expressionsstärke von CEACAM1 hat, wurden WT Mäuse per oraler Gavage mit *C. rodentium* infiziert und 10 Tage danach (*peak* Infektion, 10 dpi.) sowohl die Expression von CEACAM1 als auch die Lokalisation von *C. rodentium* im rektalen Kolon bestimmt. Über die quantitative RT-PCR zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in der CEACAM1 Expression zwischen nicht-infizierten und infizierten WT Mäusen (**Abb. 4-2, B**). Dies wurde auch durch fluoreszenzmikroskopische Analysen bestätigt (**Abb. 4-2, A**). Interessanterweise zeigte die durchflusszyto-

metrische Untersuchung des T-Zell-Kompartimentes einen leichten Anstieg der CEACAM1 Expression auf CD4⁺ T-Zellen und noch stärker ausgeprägt auf CD8⁺ T-Zellen (**Abb.4-2, C-D**).

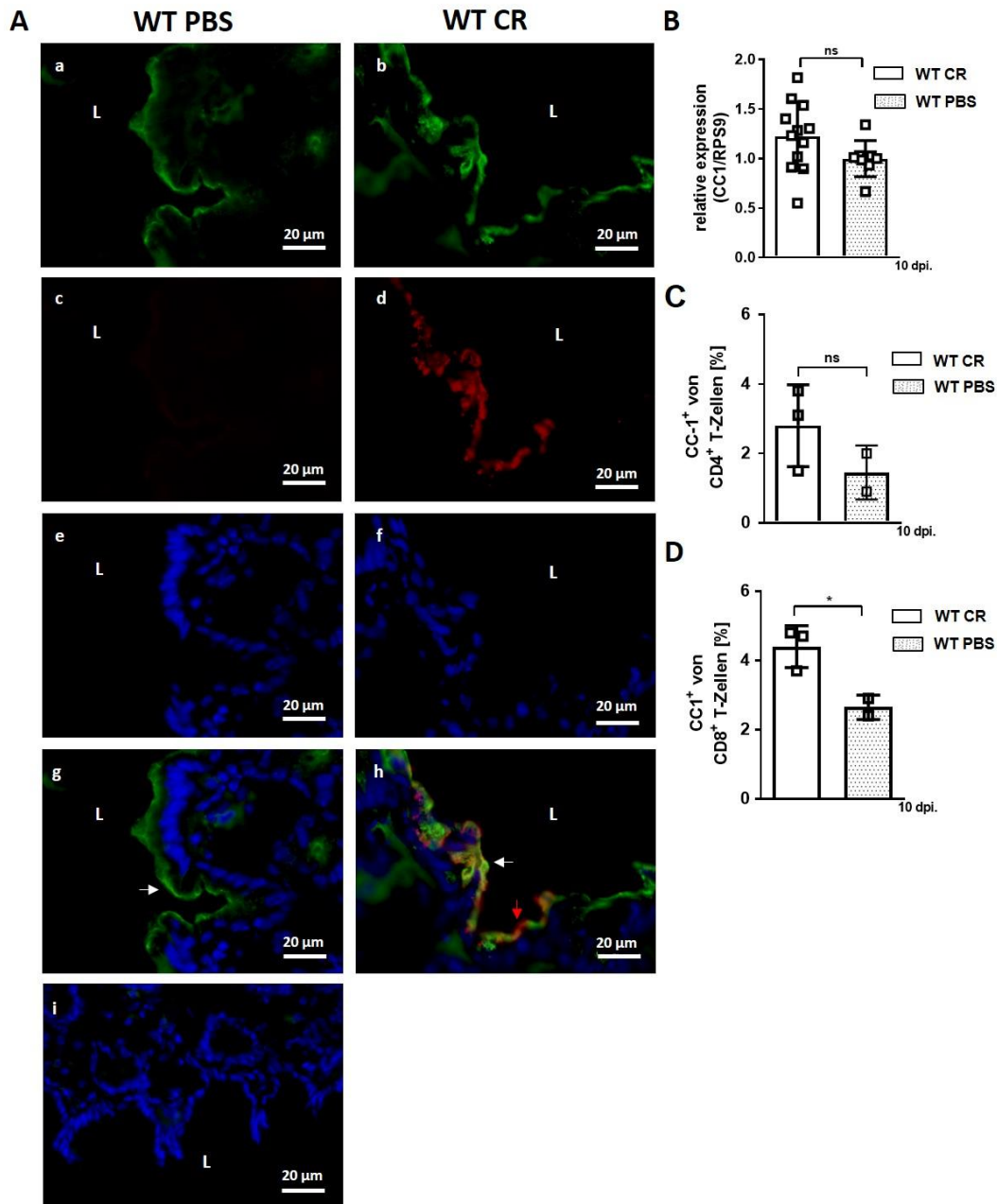


Abbildung 4-2: Auswirkungen einer bakteriellen Infektion auf die CEACAM1-Expression und Lokalisation der Bakterien im intestinalen Epithel. Gefrierdünnschnitte (5 μ m) von **A)** Exemplarische Aufnahmen PBS im Vergleich zu CR-infizierten WT-Mäusen. Die Färbung von CEACAM1 erfolgte über den mAb α ms CC-1 und einem Alexa488 Sekundärantikörper (grün; **a & b**). Zusätzlich sind die Nuclei (blau) über DAPI (**e & f**) im Einzelnen, aber auch im Overlay (**g & h**) abgebildet. (**i**) Primärantikörper Kontrolle. **d)** Zeigt die Einzelaufnahme der *C. rodentium* infizierten WT-Mäuse 10 Tage nach der Infektion (rot). Alle Fluoreszenz-Aufnahmen wurden mit bei einer 40x Vergrößerung generiert. **B)** Nach der Präparation wurden Kolon-Biopsien entnommen, RNA isoliert und über eine quantitative qPCR die relative Expression von CC1 analysiert. **C)** Durchflusszytometrische Charakterisierung der CC1-Expression auf CD4⁺ T-Zellen und **D)** CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu den PBS-Kontrollgruppen. Die statistischen Signifikanzen wurden über den Student's T-test berechnet (*: $p < 0,05$). Dargestellt ist der Mittelwert als \pm SEM in **B)** $n = 8-12$ aus 4 unabhängigen Infektionsversuchen; **C)** und **D)** $n = 2-3$ aus einem exemplarischen Versuch. **CR:** *C. rodentium*; **CC1:** CEACAM1; **ns:** nicht-signifikant; **PBS:** physiologische Kochsalzlösung; **WT:** Wildtyp; **CC1^{-/-}:** *Ceacam1^{-/-}*; **dpi:** days post-infection.

Betrachtet man die Lokalisation von *C. rodentium* im Kolon, scheint es keine exklusive Interaktion zwischen CEACAM1 und den Bakterien zu geben, da *C. rodentium* (rot) sowohl an Stellen hoher CEACAM1 Expression als auch an Stellen schwacher CEACAM1 Expression mit dem Epithel interagiert (**Abb.4-2, A b, d und h**).

4.2 Auswirkungen einer CEACAM1-Defizienz auf die *C. rodentium* induzierte Colitis

Nach dem erfolgreichen Nachweis einer CEACAM1 Expression, sowohl im Epithel des Kolons als auch auf zellulärer Ebene, sollte untersucht werden, ob der Verlauf einer bakteriellen Infektion mit *C. rodentium* durch die Deletion des *Ceacam1*-Gens (*Ceacam1*^{-/-}) beeinflusst wird. Um dies zu untersuchen, wurden *Ceacam1*^{-/-}- und WT-Mäuse mit *C. rodentium* infiziert und deren physiologische Konstitution untersucht. Zunächst wurde mit der Analyse der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) von *C. rodentium* im Faeces der Tiere über einen Versuchszeitraum von 10 Tagen begonnen. Dabei zeigte sich im Vergleich zu der Analyse in WT-Tieren eine stärkere Kolonisierung der *Ceacam1*^{-/-}-Tiere, vor allem in der frühen Infektionsphase (3 und 5 dpi.). Die maximale Kolonisierung (*Peak*-Infektion) wurde sowohl in *Ceacam1*^{-/-}- als auch in WT-Tieren 7-10 Tage nach der Infektion detektiert, wobei 10 dpi. nur noch leichte Unterschiede in der KBE im Faeces feststellbar waren (**Abb. 4-4, A**). Um die Lokalisation der Bakterien im Kolon näher zu betrachten, wurden Fluoreszenzfärbungen an Gefrierdünnschnitten des rektalen Kolons von infizierten *Ceacam1*^{-/-}- und WT-Tieren durchgeführt. Anhand der Einzelaufnahmen, aber auch in der zusammengefügte Darstellung, konnte eine Kolonisierung von *C. rodentium* bis hin zur Krypt-Basis in den *Ceacam1*^{-/-}-Tieren detektiert werden (**Abb. 4-3, B**). Im Gegensatz dazu wurden bei den infizierten WT-Tieren *C. rodentium* Bakterien nur auf der apikalen Oberfläche des intestinalen Epithels gefunden (**Abb. 4-3, A**).

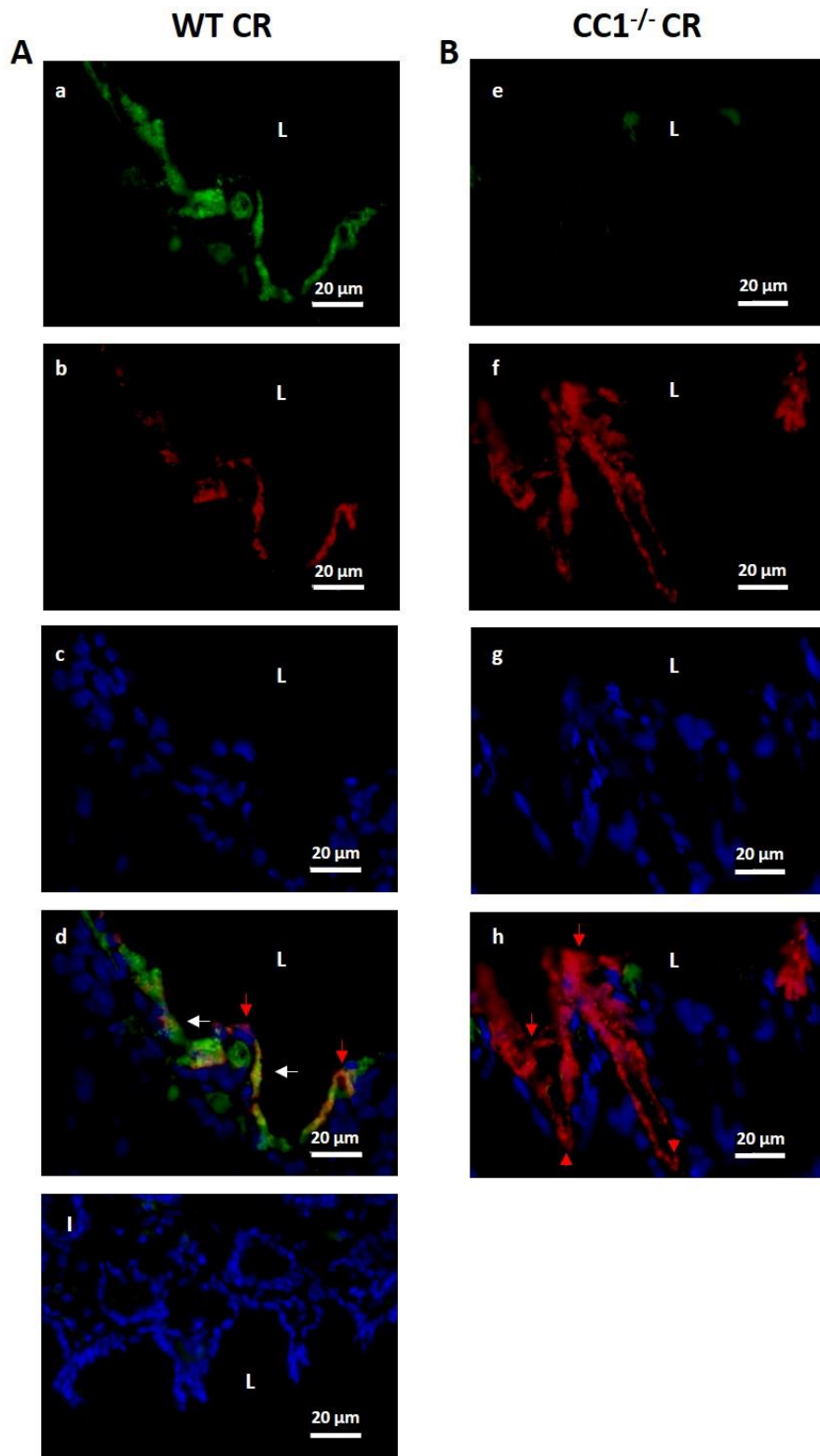


Abbildung 4-3: Auswirkungen einer CEACAM1-Defizienz auf die Kolonisierung des intestinalen Epithels mit *C. rodentium*. Gefrierdünnschnitte (5 μ m) von dem rektalen Bereich des Kolons. Die Färbung von CEACAM1 erfolgte über den mAk α ms CEACAM1 und einem Alexa488 Sekundärantikörper (grün). Die Färbung von *C. rodentium* Bakterien wurde unter Verwendung eines kommerziellen Primärantikörpers in Verbindung mit einem mRuby-Sekundärantikörper (rot) durchgeführt. Zur Orientierung wurden auch hier die Nuclei mit Hilfe einer DAPI-Färbung (blau) dargestellt. **A) a)-c)** Kolon im Querschnitt von *C. rodentium* infizierten WT-Mäusen in Einzelaufnahme. **d)** Überlagerte Darstellung. **B) e)- g)** Kolon im Querschnitt von *C. rodentium* infizierten *Ceacam1*^{-/-}-Mäusen, **h)** Überlagerte Darstellung **i)** Primärantikörperkontrolle. Für die mikroskopischen Aufnahmen wurde eine 40x Vergrößerung verwendet. 10 Tage nach der Infektion mit *C. rodentium* erfolgte die Präparation. **L:** Lumen, **weiße Pfeile:** CEACAM1-Expression, **rote Pfeile:** *C. rodentium* Färbung; **CC1^{-/-}:** *Ceacam1*^{-/-}

Um zu testen, ob auch der systemische Verlauf der Infektion in *Ceacam1*^{-/-}-Tieren beeinflusst ist, wurden sowohl das Milzgewicht als auch die KBE in der Leber 10 dpi. bestimmt. Interessanterweise zeigte die Analyse des Milzgewichtes sowie der KBE in der Leber von infizierten *Ceacam1*^{-/-}-Tieren signifikant höhere Werte im Vergleich zu infizierten WT Tieren (**Abb. 4-4, B und C**). Des Weiteren ist in **Abb. 4-4, D** das Verhältnis des Kolon-Gewichtes zur Länge graphisch dargestellt. Dieser Parameter dient als Indikator für die Pathologie im Kolon. In Homologie zu der stärkeren lokalen und systemischen Verbreitung von *C. rodentium* in *Ceacam1*^{-/-}-Tieren konnte auch hier ein signifikant höherer Wert im Vergleich zu den infizierten WT-Tieren festgestellt werden.

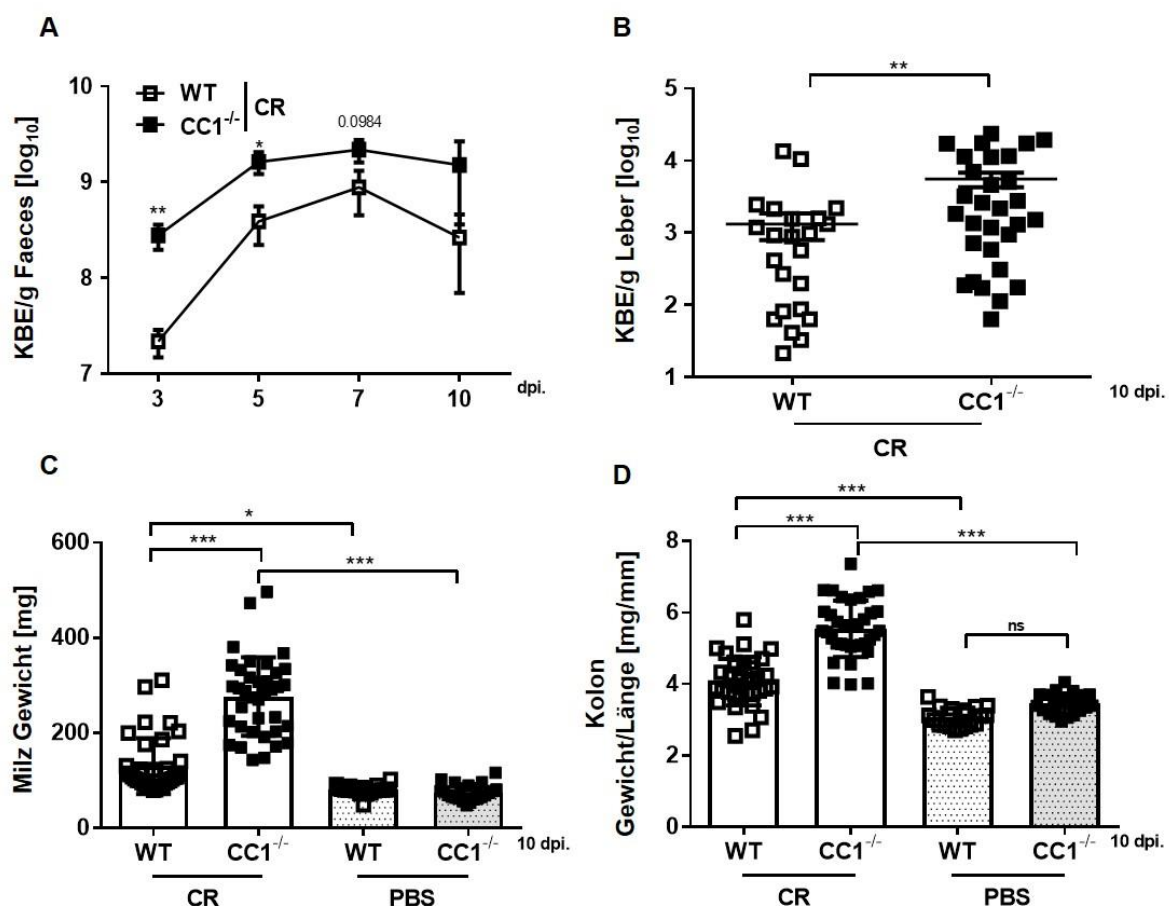


Abbildung 4-4: Charakterisierung der makroskopischen Parameter von *Ceacam1*^{-/-}-Tieren im Vergleich zum WT. A) Über den gesamten Versuchszeitraum wurden in einem zeitlichen Abstand von 2-3 Tagen Faeces-Proben entnommen und die KBE/g Faeces bestimmt. B) Zum Zeitpunkt der Analyse (10 dpi.) wurden Teile der Leber gewogen und homogenisiert. Sie dienten als Maß der systemischen Ausbreitung von *C. rodentium* im Organismus [KBE/g Leber]. C) Zusammenfassung des Milzgewichtes [mg]. D) Verhältnis des Kolon-Gewichtes zur Länge als Parameter der lokalen Entzündungsreaktion [mg/mm]. Dargestellt sind die Mittelwerte als \pm SEM von je n= 36 Tiere in den beiden CR-Gruppen; n= 24 Tiere in den PBS-Gruppen erhoben in 7 unabhängigen Experimenten. Die statistischen Signifikanzanzen wurden über den Student's T-test und den One-Way Anova mit anschließender Bonferroni-Korrektur berechnet (*: p < 0,05; **: p < 0,01; *** p < 0,001); CR: *Citrobacter rodentium*; ns: nicht-signifikant; PBS: physiologische Kochsalzlösung; WT: Wildtyp; CC1^{-/-}: *Ceacam1*^{-/-}; dpi.: days post-infection.

Die histopathologischen Analysen des rektalen Kolon-Abschnittes von infizierten *Ceacam1*^{-/-} und WT-Mäusen bestätigten ebenfalls eine stärker ausgeprägte Pathologie in *Ceacam1*^{-/-}-Tieren. So ist der Entzündungsindex sowie die Länge der Krypten in der Gruppe der infizierten *Ceacam1*^{-/-}-Tiere im Vergleich zu den infizierten WT-Tieren signifikant erhöht (Abb. 4-5, A-C).

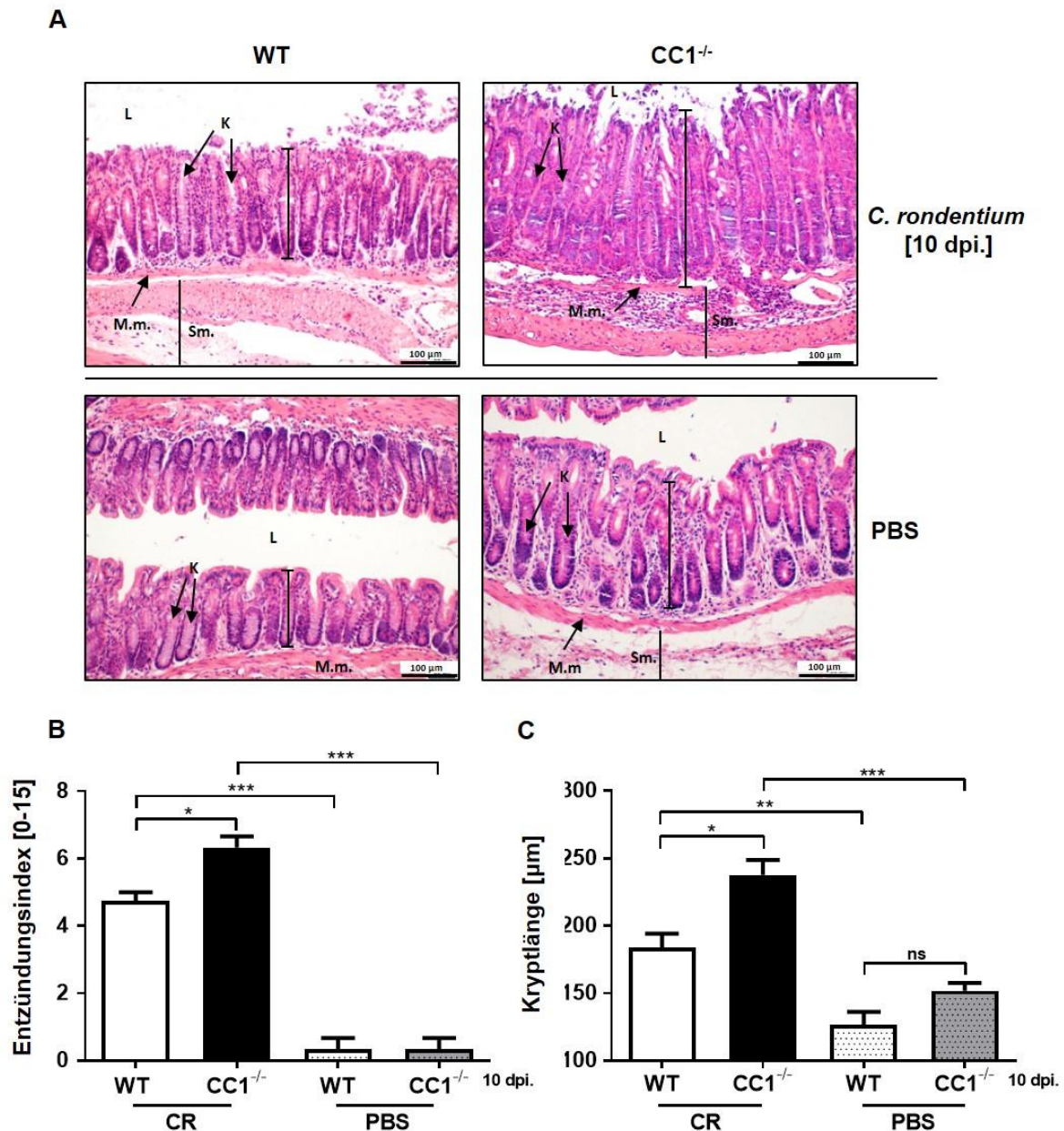


Abbildung 4-5: Einfluss von CEACAM1 auf die histopathologischen Parameter. A) Mikroskopische Aufnahmen einer exemplarischen H&E Färbung. Dabei sind infizierte WT (links) CC1^{-/-} (rechts) Tieren gegenübergestellt und im Vergleich zu den jeweiligen PBS-Gruppen (darunter) abgebildet. Die Aufnahmen wurden bei 20x Vergrößerung aufgenommen. **B)** Zusammenfassung einzelner Entzündungsparameter über den Entzündungsindex. **C)** Kryptlängen [μm] der infizierten und nicht-infizierten Gruppen. Die statistischen Signifikanzen wurden über den Student's T-test und über den One-Way Anova mit anschließender Bonferroni-Korrektur berechnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Abgebildet sind die Mittelwerte als \pm SEM von $n = 5$ in den infizierten Gruppen und $n = 4$ in den nicht-infizierten Gruppen aus zwei unabhängigen Experimenten.

CR: *Citrobacter rodentium*; **K.:** intestinale Krypten; **L.:** Lumen; **M.m.:** Muscularis mucosae; **ns:** nicht-signifikant **Sm.:** Submucosa; **WT:** Wildtyp.

Ein weiterer Parameter für die Ausprägung einer Entzündung ist die Konzentration der sezernierten Zytokine. Daher wurde die Konzentration verschiedener Zytokine im Serum von infizierten *Ceacam1*^{-/-} und WT-Tieren 10 dpi. mittels Luminex Technologie bestimmt (**Abb. 4-6, A-E**). Dabei zeigte sich eindeutig ein stärker pro-inflammatorisch geprägtes Zytokin-Profil in *Ceacam1*^{-/-}-Tieren im Vergleich zu den WT-Tieren. Die Konzentration von Interleukin-6 (IL-6) und Interferon-gamma (IFN-γ) waren im Vergleich zum Serum von infizierten WT-Tieren signifikant erhöht und auch für den Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-α) und *Macrophage inflammatory protein-1 alpha* (MIP-1α) konnten erhöhte Werte gemessen werden. Insgesamt wurden unter homöostatischen Bedingungen weder in der Pathophysiologie, noch in der Zytokinsekretion Unterschiede zwischen *Ceacam1*^{-/-} und WT-Tieren festgestellt.

Zusammenfassend zeigen die bisherigen Ergebnisse einen deutlichen Einfluss von CEACAM1 auf die Suszeptibilität für eine *C. rodentium* induzierte Kolitis. So konnten in Folge einer CEACAM1-Defizienz bisher eine massive Pathologie, sowohl auf makroskopischer sowie histologischer Ebene im Verlauf der Infektion gezeigt werden. Des Weiteren wiesen die Analysen der CEACAM1 Expression zwischen gesunden und infizierten WT-Mäusen darauf hin, dass CEACAM1 vermutlich nicht direkt mit dem Bakterium interagiert, da unabhängig von der Infektion eine kontinuierliche CEACAM1 Expression sowie Lokalisation der Bakterien im intestinalen Epithel detektiert werden konnten.

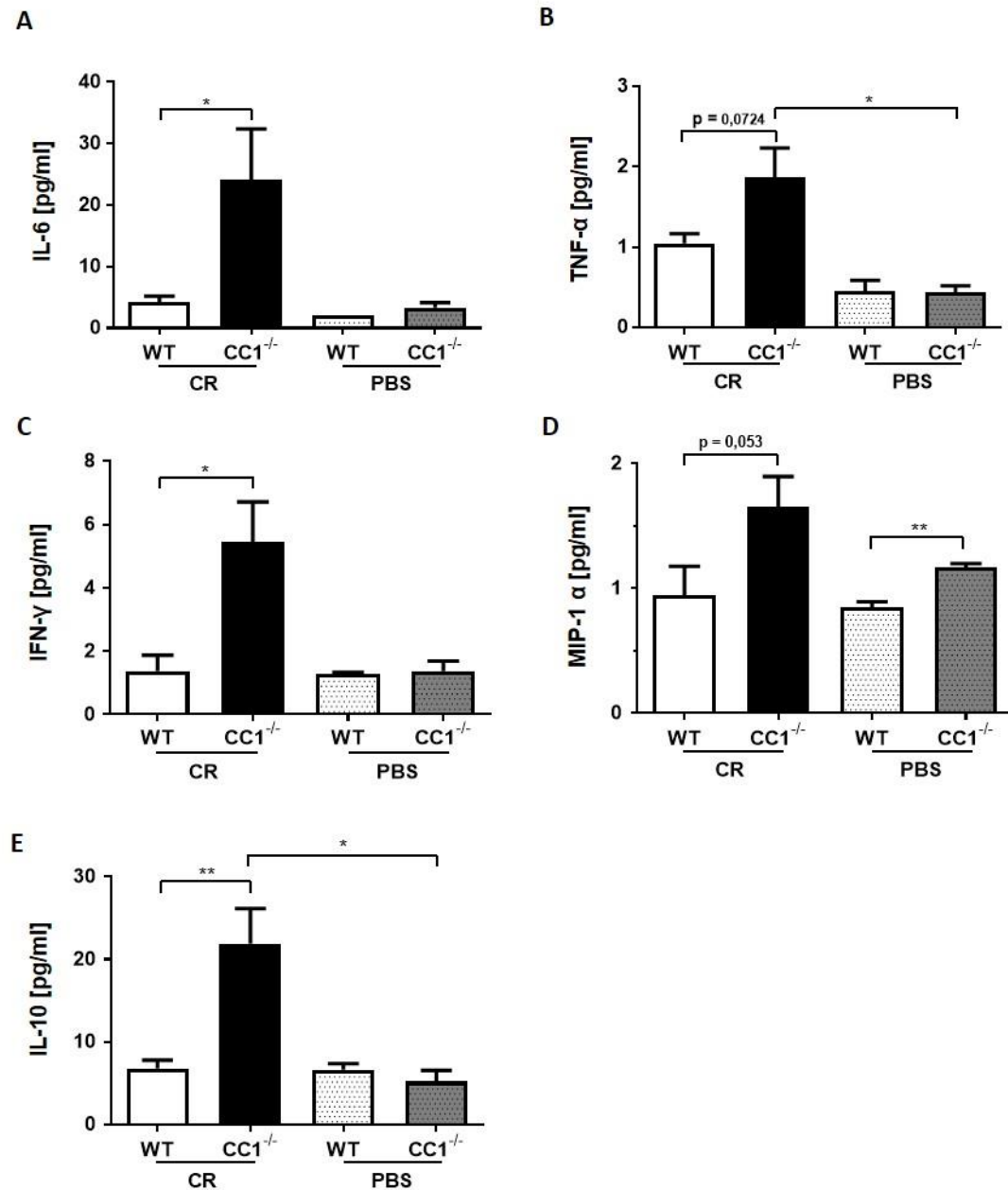


Abbildung 4-6: Serum-Zytokinprofil von *Ceacam1*^{-/-}-Tieren. Nach zehntägiger Infektion mit *C. rodentium* wurde den narkotisierten Versuchstieren über eine Punktion des Herzens Vollblut entnommen, anschließend das Serum über Zentrifugation separiert und mit Hilfe der Luminex-Technologie die Serum-Konzentration [pg/ml] einzelner Zytokine bestimmt. **A**) Interleukin-6 (IL-6) **B**) Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-α) **C**) Interferon-gamma (IFN-γ) **D**) Macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 alpha bzw. CCL3) **E**) Interleukin-10 (IL-10). Die statistischen Signifikanzen wurden über den Student's T-test und über den One-Way Anova mit anschließender Bonferroni-Korrektur berechnet (*: p < 0,05; **: p < 0,01). Dargestellt sind die Mittelwerte als ± SEM von n= 2-9 Tieren pro Gruppe aus zwei unabhängigen Infektionsversuchen. **CR:** *Citrobacter rodentium*; **ns:** nicht-signifikant; **PBS:** physiologische Kochsalzlösung; **WT:** Wildtyp; **CC1^{-/-}:** *Ceacam1*^{-/-}; **dpi:** days post-infection.

4.3 Ist das hämatopoetische oder nicht-hämatopoetische Kompartiment die treibende Kraft der Pathologie?

Die bisherigen Ergebnisse belegen, dass CEACAM1 sowohl von Zellen des hämatopoetischen sowie nicht-hämatopoetischen Systems exprimiert wird (**Kap. 4.1**). Um weiterführend zu analysieren, ob die verstärkte Pathologie bei *C. rodentium* infizierten *Ceacam1^{-/-}*-Mäusen als Reaktion auf den bakteriellen Stimulus seinen Ursprung im hämatopoetischen oder nicht-hämatopoetischen Kompartiment nimmt, wurden Knochenmark-Chimäre generiert. Der experimentelle Ablauf dieses Versuchsabschnittes ist in **Abb. 4-7, A** zusammengefasst. WT- und *Ceacam1^{-/-}*-Mäuse wurden bestrahlt und anschließend der Knochenmarktransfer durchgeführt. Nach 8-wöchiger Rekonstitutionszeit wurden alle 4 Versuchsgruppen mit *C. rodentium* infiziert. Die Analyse der bakteriellen Last im Faeces der Tiere zeigt zum Zeitpunkt 5 dpi, die bereits beschriebene höhere bakterielle Belastung in den *Ceacam1^{-/-}*-Tieren, die Knochenmark von *Ceacam1^{-/-}*-Mäusen erhielten. Interessanterweise wurde dieselbe bakterielle Last im Faeces von *Ceacam1^{-/-}*-Tieren, die WT-Knochenmark erhalten haben und WT-Tieren, die Knochenmark von *Ceacam1^{-/-}*-Tieren erhalten haben detektiert (**Abb. 4-7, B**). Im Gegensatz dazu, waren die Werte für die KBE in der Leber in WT-Mäusen denen *Ceacam1^{-/-}* Knochenmark transferiert wurde im Vergleich zum CEACAM1 komplett-*Knock Out* (*Ceacam1^{-/-}* → *Ceacam1^{-/-}*) vergleichbar (**Abb. 4-7, C**). Die Bestimmung des Milzgewichtes zeigte dagegen, dass der massive Phänotyp in WT Tieren die *Ceacam1^{-/-}*-Knochenmark erhielten aufgehoben wurde (**Abb. 4-7, D**).

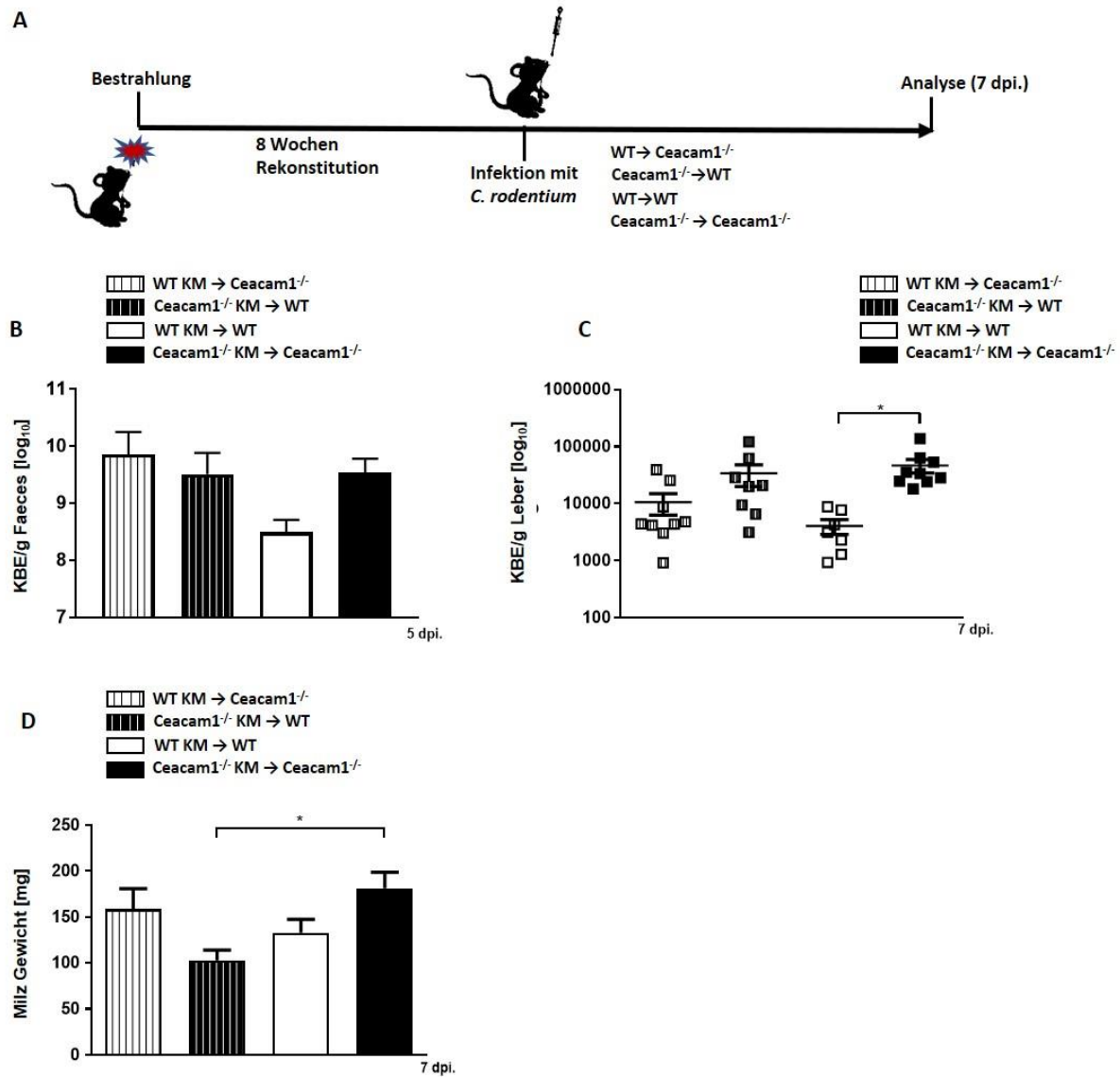


Abbildung 4-7: Generierung von Knochenmark-Chimären. Analyse des hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Kompartiments von *Ceacam1*^{-/-}-Tieren während einer bakteriellen Infektion. **A)** Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung. Nach der Bestrahlung von 1050 rad wurde am Folgetag das Knochenmark der jeweiligen Spendertiere (WT oder *Ceacam1*^{-/-}) in die Empfängertiere i.v. injiziert. Nach 8-wöchiger Rekonstitution erfolgte die Infektion mit *C. rodentium* und 7 dpi. die Analyse. **B)** Nach der Faeces-Entnahme wurde dieser homogenisiert und über Selektionsplatten die KBE/g Faeces 5 dpi. bestimmt. **C)** Zum Zeitpunkt der Analyse (7 dpi.) wurden Teile der Leber gewogen und homogenisiert und als Maß der systemischen Ausbreitung von *C. rodentium* im Organismus bestimmt [KBE/g Leber]. **D)** Zusammenfassung des Milzgewichtes [mg]. Die statistischen Signifikanzen wurden über den Student's T-test und über den One-Way Anova mit anschließender Bonferroni-Korrektur berechnet (*: $p < 0,05$). Dargestellt sind $n=7-9$ Tier aus zwei unabhängigen Infektionsversuchen. Graphisch sind die Mittelwerte als \pm SEM angegeben. **CR:** *Citrobacter rodentium*; **WT-KM:** Wildtyp-Knochenmark; **CC1^{-/-} KM:** *Ceacam1*^{-/-} Knochenmark; **WT:** Wildtyp; **CC1^{-/-}:** *Ceacam1*^{-/-}; **dpi.:** days post-infection; **KBE:** Kolonie-bildende Einheiten.

Zusammenfassend belegen diese Experimente, dass vermutlich sowohl das hämatopoetische als auch das nicht-hämatopoetische Kompartiment an der Entwicklung der starken Pathologie als Folge einer *C. rodentium* induzierten Kolitis in *Ceacam1*^{-/-}-Tieren beteiligt sind.

4.4 Regulation der intestinalen Permeabilität durch CEACAM1

Das intestinale Epithel hat in erster Linie die Funktion den Wirt vor äußeren Einflüssen zu schützen und die Homöostase des gastrointestinalen Systems aufrechtzuerhalten (**Kap. 1.1.1**). Da eine Infektion mit *C. rodentium* in genetisch suszeptiblen Mausstämmen die intestinale Permeabilität beeinträchtigen kann und eine signifikant höhere systemische Verteilung der Bakterien anhand der KBE in der Leber und des erhöhten Milzgewichtes in *Ceacam1*^{-/-}-Mäusen gemessen wurde (**Abb. 4-4, B-C**), sollte untersucht werden, ob die Expression von CEACAM1 einen Einfluss auf die intestinale Barriere und damit der Permeabilität haben könnte.

Um dies zu untersuchen, wurden Permeabilitäts-Assays mit Hilfe von Fluorochrom-markierten Dextran-Beads in gesunden Mäusen beider Gruppen, aber auch nach der Infektion mit *C. rodentium* durchgeführt. Fluorochrom-markierte Dextran-Beads wurden den Versuchstieren per oraler Gavage verabreicht und nach 4 Stunden konnte die Konzentration der Beads im Serum bestimmt werden. Dabei zeigte sich in *Ceacam1*^{-/-}-Mäusen bereits unter homöostatischen Bedingungen eine erhöhte intestinale Permeabilität im Vergleich zu den WT-Kontrollen (**Abb. 4-8, A**). Die mittlere Konzentration, der im Serum detektierten Fitc-Dextran Beads, war bei *Ceacam1*^{-/-}-Tieren um das 6-fache höher als in den WT-Mäusen, bei denen unter homöostatischen Bedingungen nur eine geringe Permeabilität nachgewiesen werden konnte. Im Verlauf einer Infektion mit *C. rodentium* zeigte sich anhand der steigenden Konzentration der Fitc-Dextran Beads in den Seren von *Ceacam1*^{-/-}-Mäusen eine exponentielle Zunahme der intestinalen Permeabilität, die verglichen mit den infizierten WT-Kontrollen um das ~13-fache erhöht war (**Abb. 4-8, B**).

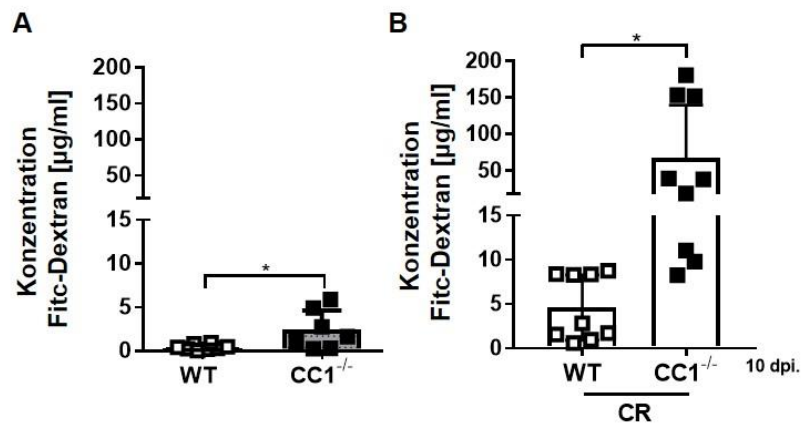


Abbildung 4-8: Bestimmung der intestinalen Permeabilität. Die Permeabilitätsmessung erfolgte *in vivo* über die orale Applikation von FITC-Dextran Beads (4kDa). Nach 4-stündiger Inkorporation wurde den narkotisierten Versuchstieren über eine Herzpunktion das Vollblut entnommen und das Serum separiert. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität spektrophotometrisch bestimmt und die Konzentration [µg/ml] berechnet werden (vergl. **Kap. 3.13.4**). Die detektierten Signale des Fluoresceins sind proportional zur Permeabilität des intestinalen Epithels. **A)** Intestinale Permeabilität unter homöostatischen Bedingungen. **B)** Permeabilitäts-Assay 10 Tage nach der Infektion mit CR. Für die statistischen Signifikanzen wurde der Student's T-test verwendet (*: $p < 0,05$). Dargestellt sind $n=8-9$ Tiere aus drei unabhängigen Experimenten. Im Balkendiagramm dargestellt sind die Mittelwerte als \pm SEM. **CR:** *Citrobacter rodentium*; **PBS:** physiologische Kochsalzlösung; **WT:** Wildtyp; **CC1^{-/-}:** *Ceacam1^{-/-}*; **dpi:** days post-infection.

Die Regulation der intestinalen Barriere erfolgt unter anderem über den Tight Junction (TJ) vermittelten Kontakt zwischen benachbarten intestinalen Epithelzellen. Die erhöhte intestinale Permeabilität könnte demnach aus einer dysfunktionalen Anordnung bzw. Expression der TJ-Proteine resultieren. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde die Expression bekannter TJ-Proteine auf mRNA-Ebene analysiert. Dabei sind in der Literatur hauptsächlich Effekte über die Proteinfamilie der Claudine und Occludine aber auch der peripheren Membranproteine der Zonula Occludens (im Speziellen von ZO-1-3) in Zusammenhang mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) und in Mausmodellen mit Bezug zur intestinalen Permeabilität beschrieben worden (Roda et al. 2010; Salim und Söderholm 2011; Henderson et al. 2011). Allerdings konnten zum Analysezeitpunkt 10 dpi. in den Kolon-Biopsien weder in infizierten *Ceacam1^{-/-}* noch in WT-Tieren ein verändertes Expressionsniveau für Claudin-3, Occludin, ZO-1 und ZO-2 bestimmt werden (**Abb. 4-9, A-D**). Daher liegt die veränderte Permeabilität der Epithelzellen in *Ceacam1^{-/-}*-Mäusen vermutlich nicht an einer Dysregulation der TJ-Proteinkomplexe.

Zusammen mit den Komplexen der Tight Junctions sind Adherens Junctions, die direkt unterhalb der TJs im apikal dem Lumen zugewandten Bereich des intestinalen Epithels exprimiert werden, an der Regulation der intestinalen Permeabilität beteiligt. Wie bereits in der Einleitung (**Kap. 1.1.1**) beschrieben, ist die Expression von Cadherinen

(speziell von E-Cadherin) charakteristisch für diese Zellverbindungen. Interessanterweise konnte nach einer Infektion mit *C. rodentium* in den *Ceacam1*^{-/-}-Mäusen eine deutlich erhöhte Expression von E-Cadherin auf mRNA-Ebene detektiert werden, wohingegen dieses Protein in den restlichen Versuchsgruppen kein verändertes Expressionsprofil aufwies (**Abb. 4-9, E**). Von den genannten abdichtenden Zellverbindungen sind sogenannte „lose“ Zell-Zellverbindungen zu unterscheiden. Dazu zählen neben Desmosomen auch Gap junctions. Studien der Arbeitsgruppen von Ey und Kollegen konnten einen Einfluss des Gap Junction Proteins Connexin-43 (Cox-43) auf die intestinale Permeabilität zeigen, sodass auch in der vorliegenden Arbeit dessen Expression analysiert wurde (Ey et al. 2009). Dabei konnte zwar eine signifikant steigende Expression als Reaktion auf die Infektion in *Ceacam1*^{-/-}-Tieren detektiert werden, jedoch nicht im Vergleich zu der infizierten WT-Kontrollgruppe, sodass nicht von einem CEACAM1 vermittelten Einfluss ausgegangen werden kann (**Abb.4-9, F**).

Neben den Zell-Zell-Kontakten zur Aufrechterhaltung der intestinalen Barriere sind antimikrobielle Proteine (AMPs), gelöst in der inneren Muzin-Schicht, (**Kap. 1.1.1**) ein wichtiger Kontrollmechanismus. Diese Proteine dienen unter homöostatischen Bedingungen der Abwehr von Pathogenen, indem sie den direkten Kontakt mit dem intestinalen Epithel verhindern. In den letzten Jahren konnten unterschiedliche Studien einen Zusammenhang zwischen der Expression von α -Defensin 5 und der Regulation der intestinalen Permeabilität belegen (Wehkamp et al. 2005b). Daher wurde dessen Expression ebenfalls in dem Modell der bakteriell-induzierten Kolitis analysiert. Dabei konnte, im Vergleich zu den restlichen Versuchsgruppen, eine verringerte Expression in den *C. rodentium* infizierten *Ceacam1*^{-/-}-Tieren detektiert werden (**Abb.4-9, G**).

Zusammenfassend weisen die Analysen auf einen Einfluss von CEACAM1 auf die intestinale Barriere-Funktion hin. Die erhöhte Permeabilität des Epithels sowie eine verringerte Expression von antimikrobiellen Proteinen in *Ceacam1*^{-/-}- Tieren zeigt eine deutliche Beteiligung des nicht-hämatopoetischen Systems an der bakteriellen Immunabwehr im *C. rodentium* vermitteltem Kolitis Modell.

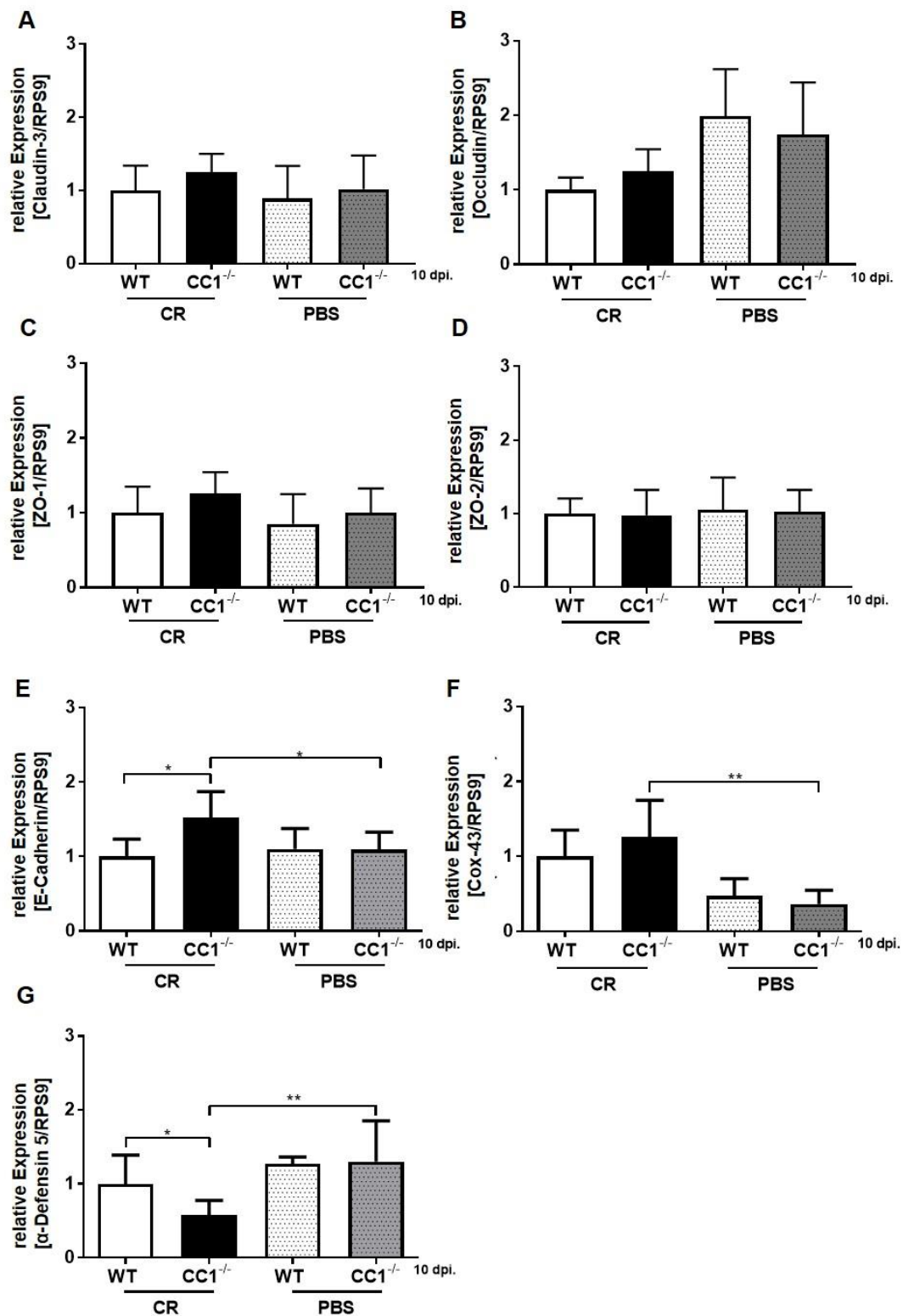


Abbildung 4-9: Expression von Zell-Zell Kontakt vermittelnden Proteinkomplexen und antimikrobieller Proteine im intestinalen Epithel. Nach der Präparation (10 dpi.) wurden Kolon-Biopsien entnommen, RNA isoliert und über eine quantitative RT-PCR die relative Expression von einigen Bestandteilen der apikalen Zell-Zell vermittelnden Komplexe durchgeführt. **A)** Claudin-3, **B)** Occludin, **C)** Zonula Occludens 1, **D)** Zonula Occludens 2, **E)** E-Cadherin, **F)** Connexin-43 und **G)** α-Defensin 5 analysiert. Die statistischen Signifikanzen wurden über den Student's T-test und One-Way Anova mit anschließender Bonferroni-Korrektur berechnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$). Dargestellt sind die Mittelwerte als \pm SEM von

4.5 Bedeutung von CEACAM1 für Effektor-T-Zell-vermittelte Immunreaktionen

Das adaptive Immunsystem stellt sich vor allem im intestinalen Milieu unterschiedlicher Herausforderungen, so muss es gegenüber der kommensalen Mikrobiota tolerant reagieren, um den Zustand der Homöostase zu gewährleisten, gleichzeitig aber effiziente Abwehrmechanismen gegen Pathogene induzieren (Biancone et al. 2002). Bezüglich des in dieser Arbeit verwendeten Infektionsmodells der *C. rodentium* induzierten Kolitis konnten diverse Studien bereits zeigen, dass in Folge der Infektion eine T_H1- und T_H17-vermittelte Entzündungsreaktion von zentraler Bedeutung für die Abwehr und Eliminierung des non-invasiven Mauspathogens ist (Lis M. Higgins et al. 1999; Symonds et al. 2009).

4.5.1 CEACAM1 und CD4⁺ Effektor-T-Zellen

Um den Einfluss der CEACAM1 Expression auf CD4⁺ Effektor-T-Zellen einer *C. rodentium* induzierten Kolitis zu analysieren, wurden durchflusszytometrische Analysen der Lamina propria des Kolons von infizierten und nicht-infizierten *Ceacam1^{-/-}* und WT-Mäusen durchgeführt. Wie bereits in der Literatur beschrieben, ist der prozentuale Anteil der CD4⁺ T-Zellen in *Ceacam1^{-/-}* sowohl unter Homöostase als auch bei Infektion leicht erhöht (Huang et al. 2015) (**Abb. 4-10, A**).

Die Funktionalität bzw. Aktivität von T-Zellen wird über die Expression der Aktivierungsmarker L-Selectin (CD62L) und CD69 bestimmt. Dabei können über die Messung von CD62L Aussagen über den prozentualen Anteil von naiven CD4⁺ T-Zellen getroffen und darüber indirekt Rückschlüsse auf die Aktivität gewonnen werden. Im Gegensatz dazu gibt die Expression von CD69 auf der Oberfläche von T-Zellen Aufschluss über deren Aktivierung, da er als früher Aktivierungsmarker beschrieben wurde (Gerberick et al. 1997).

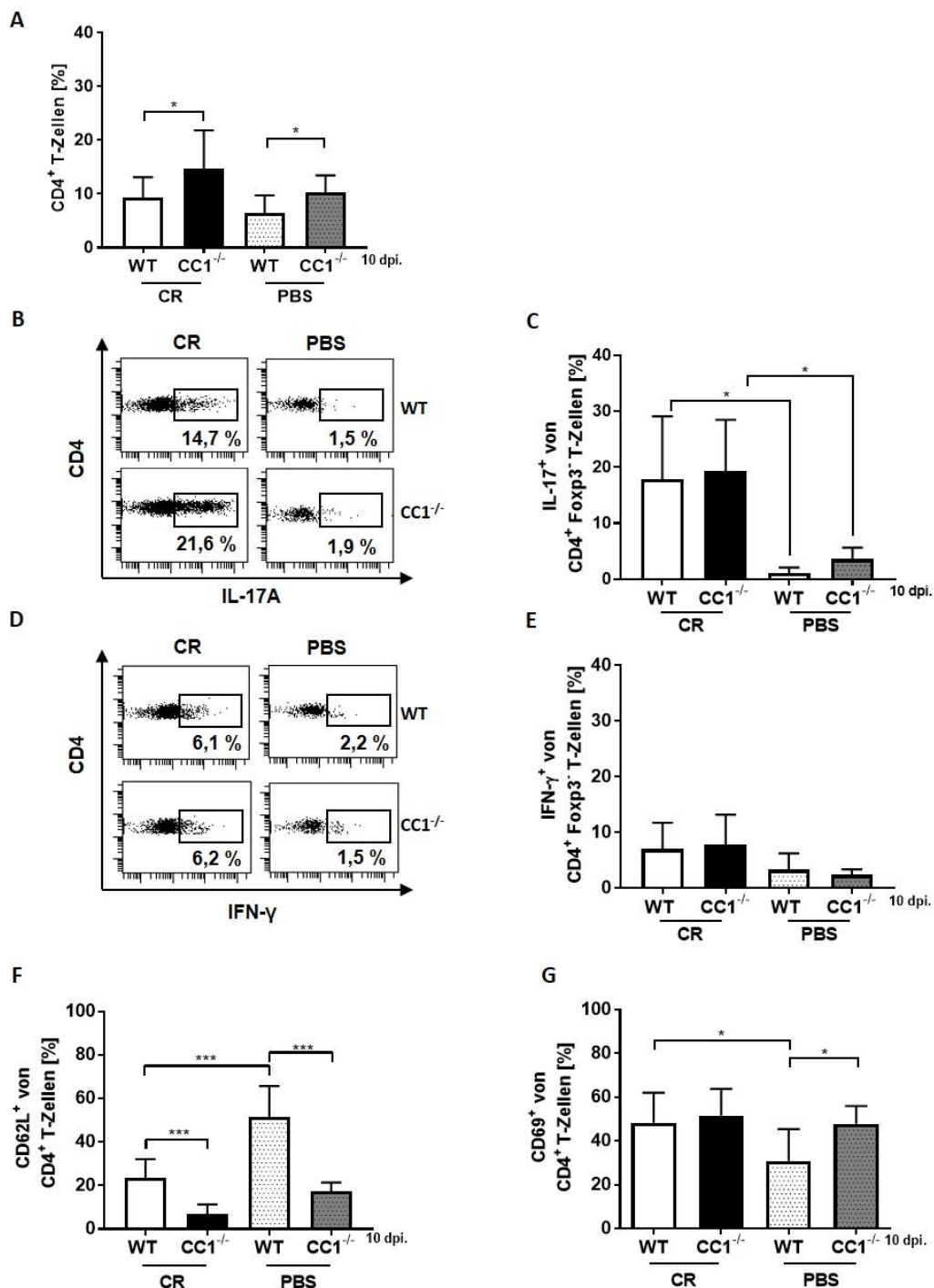


Abbildung 4-10: Das CD4⁺ Effektor-T-Zell-Kompartiment in *Ceacam1*^{-/-}-Mäusen. Nach der Isolation der Lamina Propria Lymphozyten aus CR-infizierten und gesunden *Ceacam1*^{-/-}-oder WT-Tieren erfolgte die durchflusszytometrische Charakterisierung des CD4⁺ T-Zellkompartimentes. **A)** Prozentualer Anteil der CD4⁺ T-Zellen von lebenden Lymphozyten in der Lamina Propria. **B)** Exemplarischer Dot-Plot der durchflusszytometrischen Charakterisierung von T_H1-Zellen über die Expression von IFN- γ . **C)** Zusammenfassende Darstellung des prozentualen Anteils von IFN- γ ⁺ T_H1-Zellen aus der Gesamtpopulation lebender CD4⁺FoxP3⁺ T-Zellen. **D)** Exemplarischer Dot-Plot der durchflusszytometrischen Messung von T_H17-Zellen über die Expression von IL-17A. **E)** Graphische Zusammenfassung des prozentualen Anteils von IL-17A⁺ T_H17 T-Zellen aus der Gesamtpopulation lebender CD4⁺FoxP3⁺ T-Zellen. **F)** Expression des Aktivierungsmarkers CD62L auf CD4⁺ T-Zellen. **G)** Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf CD4⁺ T-Zellen. Die statistischen Signifikanzen wurden über den Student's T-test berechnet und den One-Way Anova mit anschließender Bonferroni-Korrektur berechnet (*: p < 0,05 ***; p < 0,001). Im Balkendiagramm sind die Mittelwerte als \pm SEM in C) und E) von n = 4-6 aus zwei unabhängigen Experimenten; A), F) und G) n = 6-10 aus drei unabhängigen Experimenten. **CR:** *Citrobacter rodentium*; **PBS:** physiologische Kochsalzlösung; **WT:** Wildtyp; **CC1^{-/-}:** *Ceacam1*^{-/-}; **dpi.:** days post-infection.

Die Resultate der durchflusszytometrischen Analysen der CD4⁺ T-Zellen weisen bereits unter homöostatischen Bedingungen, gezeigt anhand der reduzierten CD62L und erhöhten CD69 Expression, auf einen aktivierten Phänotyp in *Ceacam1*^{-/-}-Tieren im Vergleich zu den WT-Kontrollen hin. Nach zehntätiger Infektion mit *C. rodentium* konnten allerdings keine Unterschiede im Expressionsprofil der genannten Aktivierungsmarker in *Ceacam1*^{-/-}- und WT-Tieren detektiert werden (**Abb.4-10, F-G**). Auch zeigten sich keine Unterschiede im prozentualen Anteil von T_H1-Zellen, gemessen anhand der intrazellulären Expression von IFN-γ oder der T_H17-Zellen, gemessen über die intrazelluläre IL-17A Expression, zwischen den einzelnen Gruppen (**Abb.4-10, B-E**).

Zusammenfassend scheint sich die CEACAM1-Defizienz im Mausorganismus nur geringfügig auf das CD4⁺ T-Zellkompartiment auszuwirken, da die *C. rodentium* typischen T_H1- und T_H17-vermittelten Immunantworten sich in *Ceacam1*^{-/-}- und WT-Tieren sehr ähnlich verhalten.

4.5.2 CEACAM1 und CD8⁺ Effektor-T-Zellen

Wie im vorangegangenen Kapitel für die CD4⁺ T-Zellen wurden auch die CD8⁺ T-Zellen der Lamina propria von nicht-infizierten und infizierten *Ceacam1*^{-/-}- und WT-Mäusen durchflusszytometrisch charakterisiert. Während keine Unterschiede im prozentualen Anteil der CD8⁺ T-Zellen im Kolon festgestellt werden konnten (**Abb. 4-11, A**), zeigte sich unabhängig von der bakteriellen Infektion, anhand der reduzierten CD62L und erhöhten CD69 Expression, eine signifikant stärkere Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen in *Ceacam1*^{-/-}-Tieren im Vergleich zu den WT-Kontrollen. Interessanterweise wiesen CD8⁺ T-Zellen, im Gegensatz zu den CD4⁺ T-Zellen, eine gesteigerte Aktivierung als Reaktion auf den bakteriellen Stimulus auf. Dies wird vor allem anhand der signifikant zunehmenden *Mean fluorescence intensity* (MFI) von CD69 in der infizierten *Ceacam1*^{-/-}-Gruppe deutlich (**Abb. 4-11; B-D**).

Ähnlich verhielt es sich in Bezug auf ihre zytotoxische Kapazität, gemessen anhand der Expression von Granzym B (GrzB). So zeigten CD8⁺ T-Zellen aus *Ceacam1*^{-/-}-Mäusen eine konstitutive GrzB-Expression im Gegensatz zu den CD8⁺ T-Zellen aus WT-Mäusen, die als Reaktion auf die bakterielle Infektion ihre GrzB-Expression hochregulierten (**Abb. 4-11, E**).

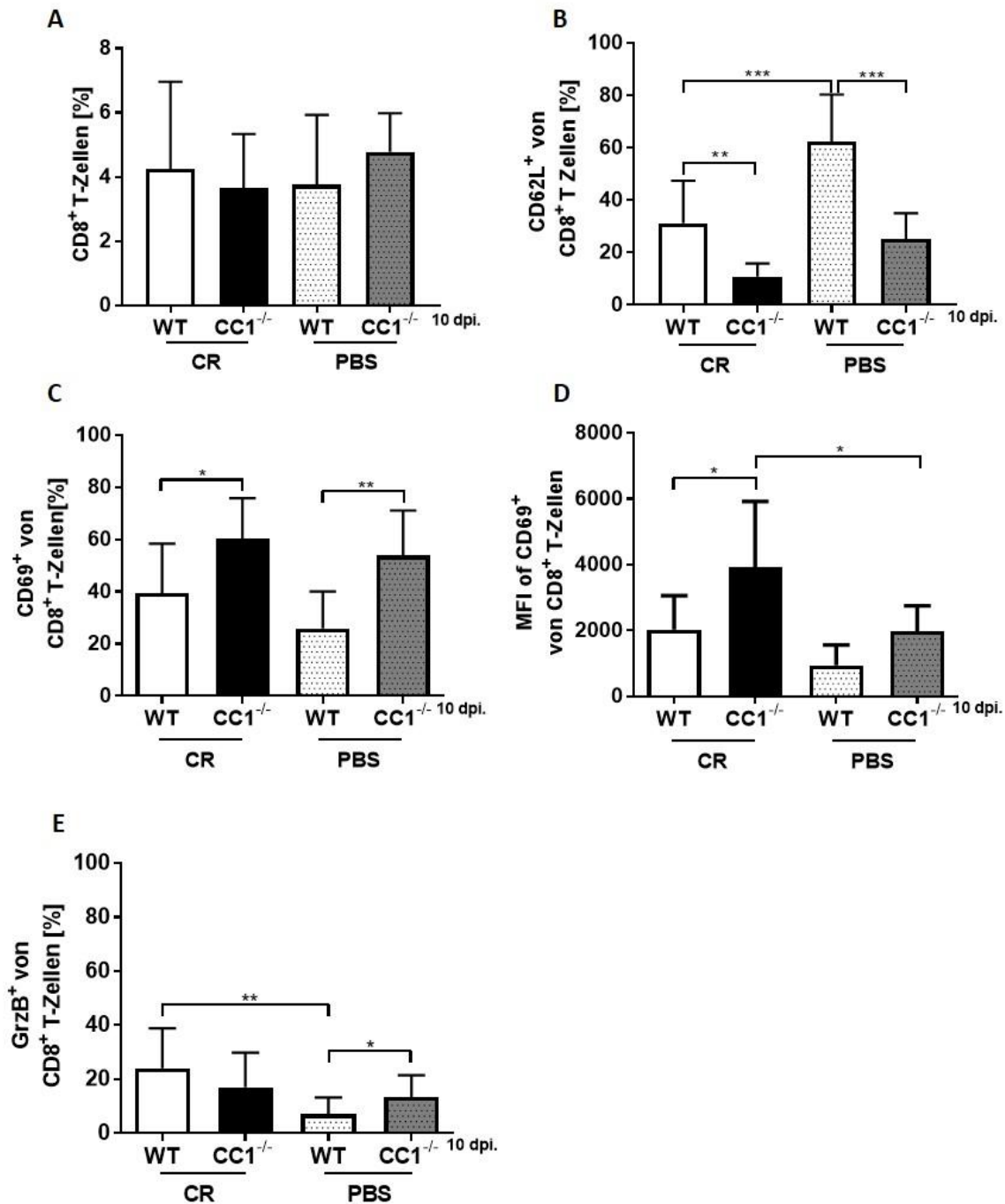


Abbildung 4-11: Das CD8⁺ Effektor-T-Zell-Kompartiment in *Ceacam1*^{-/-} Mäusen. Nach der Isolation der Lamina Propria Lymphozyten aus CR infizierten und gesunden *Ceacam1*^{-/-}-oder WT-Tieren erfolgte die durchflusszytometrische Charakterisierung des CD8⁺ T-Zellkompartimentes. **A)** Prozentualer Anteil der CD8⁺ T-Zellen der Lamina Propria. **B)** Expression von CD62L auf CD8⁺ T-Zellen. **C)** Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf CD8⁺ T-Zellen. **D)** Mean fluorescence intensity (MFI) des Aktivierungsmarkers CD69 auf CD8⁺ T-Zellen. **E)** Zytotoxische Kapazität von CD8⁺ T-Zellen gemessen über GrzB in der Lamina Propria. Die statistischen Signifikanzen wurden über den Student's T-test und den One-Way Anova mit anschließender Bonferroni-Korrektur berechnet (*: p < 0,05; **: p < 0,05; *** p < 0,001). Im Balkendiagramm sind die Mittelwerte als ± SEM von n = 6-10 Tieren aus drei unabhängigen Infektionsversuchen dargestellt. **CR:** *Citrobacter rodentium*; **PBS:** physiologische Kochsalzlösung; **WT:** Wildtyp; **CC1^{-/-}:** *Ceacam1*^{-/-}; **dpi.:** days post-infection.

Neben den Effektor-Funktionen zur Abwehr schädlicher Antigene ist die Expression inhibitorischer Moleküle (z.B.: PD-1 und CTLA-4) ein wichtiger regulatorischer Mechanismus von T-Zellen, der im Allgemeinen der Prävention von überschießenden

Immunreaktionen und den damit einhergehenden Gewebsschädigungen dient (vergl. **Kap. 1.1.2.3**) und (Liu und Lefrancois 2004). Dieser Regulationsmechanismus ist dabei vielfach für die zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen in dem Kontext von viralen Infektionen beschrieben worden (Blackburn et al. 2008). Auf Grund des starken Phänotyps der *Ceacam1*^{-/-} Mäuse im Verlauf der *C. rodentium* induzierten Kolitis (**Kap. 4.2**) sollte geklärt werden, ob eine Fehlregulation der inhibitorischen Moleküle im CD8⁺ T-Zellkompartiment vorliegen könnte. Tatsächlich belegen sowohl die exemplarischen Dot-Plots für PD-1 und CTLA-4 als auch die Zusammenfassungen äußerst überzeugend eine veränderte Regulation der inhibitorischen Moleküle in *Ceacam1*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen als Reaktion auf die Infektion mit *C. rodentium* (**Abb. 4-12, C-D**). Weder für PD-1 noch für CTLA-4 konnte eine Induktion der inhibitorischen Moleküle in Folge der Infektion mit *C. rodentium* detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigten infizierte WT-Mäuse 10 dpi. eine signifikant erhöhte Expression sowohl für PD-1 als auch CTLA-4.

Der höhere Aktivierungsgrad und vor allem die reduzierte Expression der inhibitorischen Moleküle PD-1 und CTLA-4 auf CD8⁺ T-Zellen von infizierten *Ceacam1*^{-/-} Mäusen im Verlauf der *C. rodentium* Infektion deuten auf eine dysfunktionale, hyperinflammatorische CD8⁺ T-Zellantwort hin.

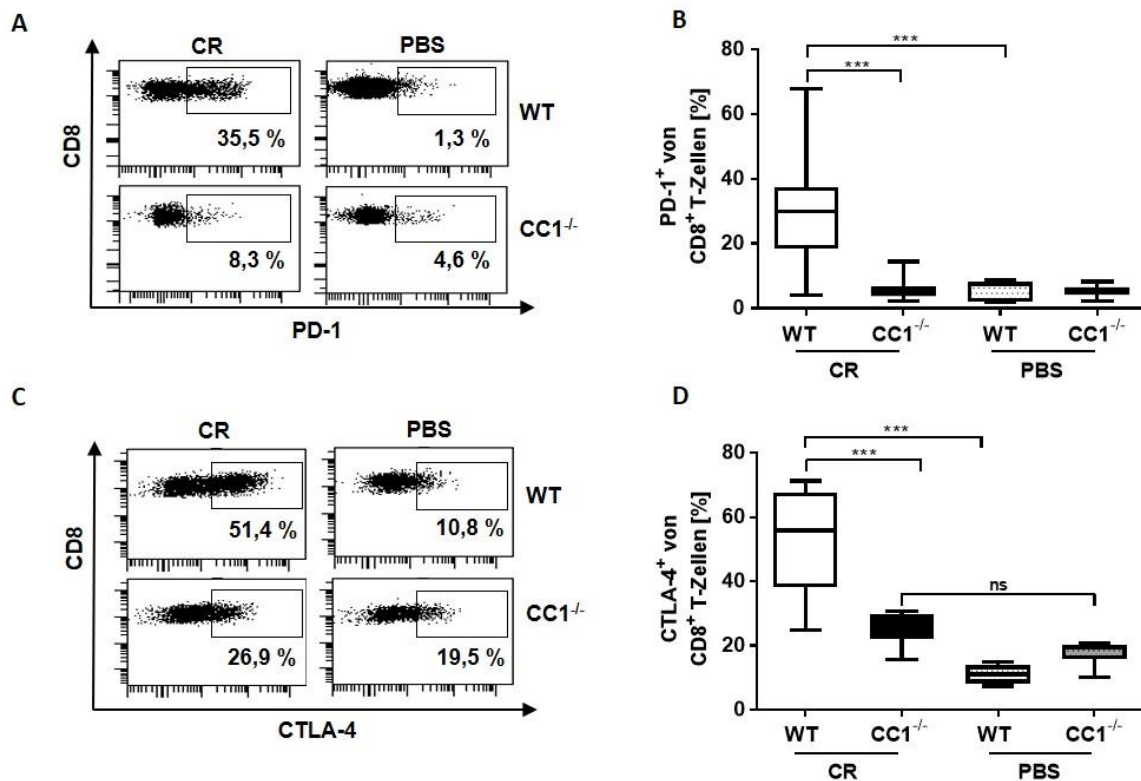


Abbildung 4-12: Expression inhibitorischer Moleküle von CD8⁺ T-Zellen. Nach der Isolation der Lamina Propria Lymphozyten aus CR-infizierten und gesunden *Ceacam1*^{-/-} oder WT-Tieren erfolgte die durchflusszytometrische Charakterisierung der inhibitorischen Moleküle. **A)** Exemplarischer Dot-Plot der PD-1 Expression von CD8⁺ T-Zellen der Lamina Propria. **B)** Graphische Zusammenfassung des prozentualen Anteils der PD-1⁺ Zellen von lebenden CD8⁺ T-Zellen der LPL. **C)** Exemplarischer Dot-Plot der CTLA-4 Expression von CD8⁺ T-Zellen der Lamina Propria. **D)** Graphische Zusammenfassung des prozentualen Anteils der CTLA-4⁺ Zellen von lebenden CD8⁺ T-Zellen der Lamina Propria. Die prozentualen Angaben beziehen sich auf die Gesamtpopulation lebender CD8⁺CD3⁺ T-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM im Box und Whiskers Diagramm aus 5 unabhängigen Experimenten mit n= 21-9 Tieren. Die statistischen Signifikanzen wurden über den Student's t-Test oder dem One-Way Anova mit anschließender Bonferroni-Korrektur berechnet (*** p < 0,001). **CR:** *Citrobacter rodentium*; **ns:** nicht-signifikant; **PBS:** physiologische Kochsalzlösung; **WT:** Wildtyp; **CC1^{-/-}:** *Ceacam1*^{-/-}; **dpi.:** days post-infection.

4.6 Analyse von *Ceacam1*^{-/-} CD8⁺ T-Lymphozyten *in vitro*

Auf Grund der Resultate im vorangegangenen Kapitel sollte die Funktionalität der CD8⁺ T-Zellen in *Ceacam1*^{-/-}-Mäusen detaillierter charakterisiert werden. Dazu wurden CD8⁺ T-Zellen aus der Milz von *Ceacam1*^{-/-} und WT-Mäusen isoliert, CFSE markiert und *in vitro* mit αCD3 stimuliert.

Zuerst wurde die proliferative Kapazität der CD8⁺ T-Zellen über den Verlust der CFSE-Markierung im Durchflusszytometer unter den genannten Versuchsbedingungen bestimmt. Über den Versuchszeitraum von 3 Tagen konnten keine Unterschiede in der Proliferation zwischen den CD8⁺ T-Zellen aus *Ceacam1*^{-/-} und WT-Mäusen detektiert werden. Interessanterweise zeigte der zeitliche Verlauf der PD1 Expression, dass die CD8⁺ T-Zellen aus *Ceacam1*^{-/-}-Tieren zwar in der Lage sind die PD-1 Expression als

Antwort auf den T-Zell aktivierenden α CD3-Stimulus hoch zu regulieren, jedoch im Vergleich zu den CD8⁺ T-Zellen aus WT-Mäusen mit einer zeitlichen Verzögerung. Während die CD8⁺ T-Zellen aus WT-Mäusen bereits nach 24 h eine deutliche PD-1 Expression aufwiesen, zeigten die CD8⁺ T-Zellen aus *Ceacam1*^{-/-} eine signifikant niedrigere Expression zum gleichen Zeitpunkt. Dieses Phänomen konnte auch 48h nach Stimulation der CD8⁺ T-Zellen aus *Ceacam1*^{-/-} Mäusen detektiert werden (**Abb. 4-13, B**).

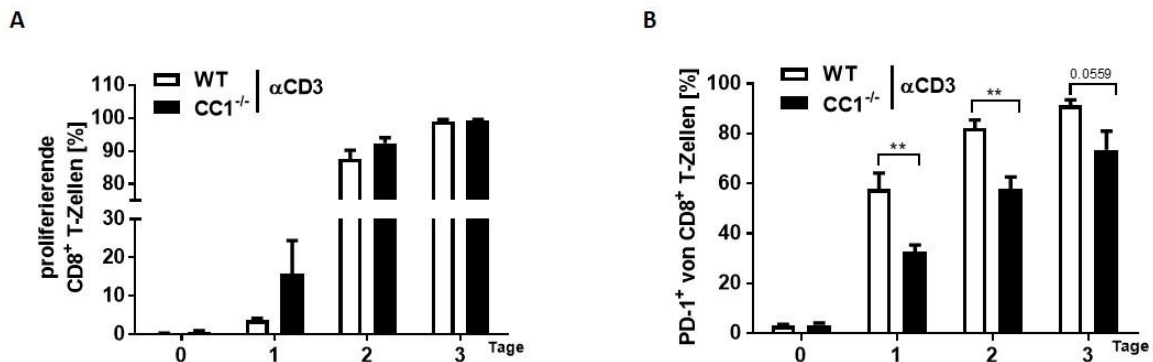


Abbildung 4-13: In vitro Analyse von *Ceacam1*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen. Nach der Isolation der Splenozyten aus *Ceacam1*^{-/-} und WT-Tieren wurden die CD8⁺ T-Zellen magnetisch angereichert und über den Zeitraum von 3 Tagen mit α CD3 [0,75 μ g/ml] stimuliert. **A)** Proliferative-Kapazität von *Ceacam1*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen (**Kap. 3.12.5**). **B)** Zeitlicher Verlauf der PD-1 Expression von *Ceacam1*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen. Im Balkendiagramm sind die Mittelwerte als \pm SEM von 2 unabhängigen Experimenten (n= 6-7) dargestellt. Die statistischen Signifikanzen wurden über den Student's t-Test berechnet (*: p < 0,05; **: p < 0,05; *** p < 0,001). **CR:** *Citrobacter rodentium*; **CFSE:** Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester; **PBS:** physiologische Kochsalzlösung; **WT:** Wildtyp; **CC1^{-/-}:** *Ceacam1*^{-/-}; **dpi.:** days post-infection.

Neben der durchflusszytometrischen Analyse wurden auch hier die Konzentrationen der sezernierten Zytokine in den Zellkulturüberständen als Indikator für die T-Zellaktivität über die Luminex-Technologie bestimmt (**Kap. 3.11.8**). Die Messungen, zusammengefasst in **Abb. 4-14**, zeigen anschaulich eine höhere Konzentration der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, IL-17A und TNF- α im Zellkulturüberstand der stimulierten CD8⁺ T-Zellen aus *Ceacam1*^{-/-}-Tieren im Vergleich zu CD8⁺ T-Zellen aus WT-Mäusen. Im Gegensatz dazu lag die Konzentrationen des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 in beiden Gruppen auf einem vergleichbaren Niveau (**Abb. 4.14, D**). Bei näherer Betrachtung des IL-6 Profils konnte eine kontinuierlich zunehmende Konzentration bis hin zu $1478 \pm 125,2$ pg/ml bei den CD8⁺ T-Zellen aus *Ceacam1*^{-/-}-Mäusen verglichen mit $569,8 \pm 85,52$ pg/ml der CD8⁺ T-Zellen aus WT-Mäusen detektiert werden. In Gegensatz dazu konnte eine IL-17A Sekretion erst nach dreitägiger Stimulation detektiert werden. Dabei wurde eine im Vergleich zum WT ($981,5 \pm 212,2$ pg/ml) deutlich höhere Endkonzentration (3550 ± 1369 pg/ml) der IL-17A Sekretion in CD8⁺ T-Zellen aus *Ceacam1*^{-/-}-Mäusen festgestellt. Des Weiteren

wurde für das pro-inflammatorische Zytokin TNF- α im Gegensatz zu den anderen von CD8⁺ T-Zellen aus *Ceacam1*^{-/-}-Mäusen produzierten Zytokinen sehr früh sezerniert, da bereits 24h nach der Stimulation eine deutliche TNF- α Konzentration ($95,87 \pm 15,32$ pg/ml) in den Zellkulturüberständen verglichen mit den WT CD8⁺ T-Zellen ($52,04 \pm 6,59$ pg/ml) messbar war. Im zeitlichen Verlauf gleichen sich die Konzentrationen in beiden Gruppen hingegen auf ein ähnliches Niveau von im Mittel ~200 pg/ml an.

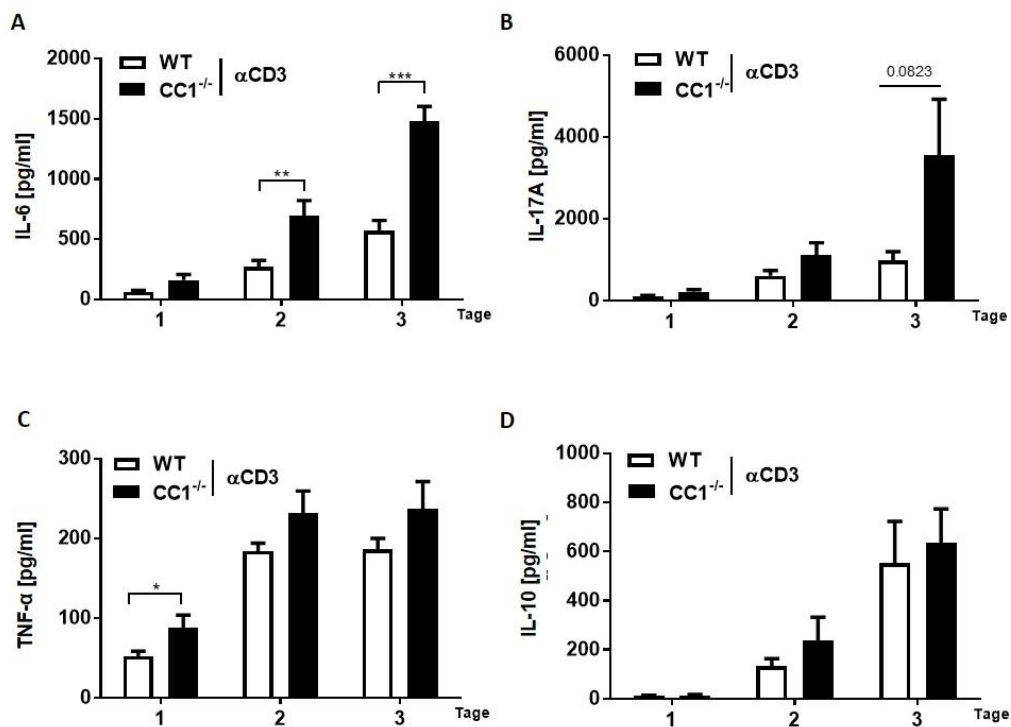


Abbildung 4-14: In vitro Zytokinprofil von stimulierten *Ceacam1*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen. Die isolierten und angereicherten Splenozyten, wurden wie für **Abb.4 13** beschrieben behandelt. Parallel wurden die Zellkulturüberstände wie angegeben täglich entnommen, um die Zytokinproduktion im zeitlichen Verlauf analysieren zu können. **A)** IL-6. **B)** IL-17A. **C)** TNF- α . **D)** IL-10. Im Balkendiagramm sind die Mittelwerte als \pm SEM von 2 unabhängigen Experimenten (n= 6-7) dargestellt. Die statistischen Signifikanzen wurden über den Student's t-Test berechnet (**: p< 0,05). **CR:** *Citrobacter rodentium*; **CFSE:** Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester **PBS:** physiologische Kochsalzlösung; **WT:** Wildtyp; **CC1^{-/-}:** *Ceacam1*^{-/-}; **days p.s.:** days post-stimulation.

Insgesamt deuten die bisherigen Resultate der *in vivo* und *in vitro* Analysen auf einen grundsätzlich hyper-inflammatorischen Charakter der CD8⁺ T-Zellen in *Ceacam1*^{-/-}-Mäusen hin.

4.7 Depletion von CD8⁺ T-Lymphozyten in *Ceacam1*^{-/-}-Mäusen führt zu einer reduzierten Pathologie nach Infektion mit *Citrobacter rodentium*

Die bisherigen Ergebnisse lassen auf die Hypothese schließen, dass *C. rodentium* in infizierten *Ceacam1*^{-/-}-Mäusen eine unkontrollierte CD8⁺ T-Zellantwort induzieren könnte, die in einer massiven Kolon-Pathologie resultiert. Um diese Hypothese zu testen, wurden WT- und *Ceacam1*^{-/-}-Mäuse mit *C. rodentium* infiziert und gleichzeitig in zwei Versuchsgruppen eingeteilt. In eine Gruppe dessen CD8⁺ T-Zellkompartiment durch die Applikation eines monoklonalen αCD8 Antikörpers depletiert wurde und eine in denen keine Depletion erfolgte. Um eine erfolgreiche Depletion der CD8⁺-Lymphozyten zu bestätigen, wurden Zellsuspensionen der unterschiedlichen Organe zum Zeitpunkt der Analyse (10 dpi.) durchflusszytometrisch untersucht. Wie exemplarisch im Dot-Plot, sowie aus der graphischen Zusammenfassung ersichtlich ist, konnte eine effiziente Depletion mit einem mittleren prozentualen Anteil von 0,37 % an CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu 11 % der unbehandelten Gruppen, bestätigt werden (**Abb. 4-15 A und B**).

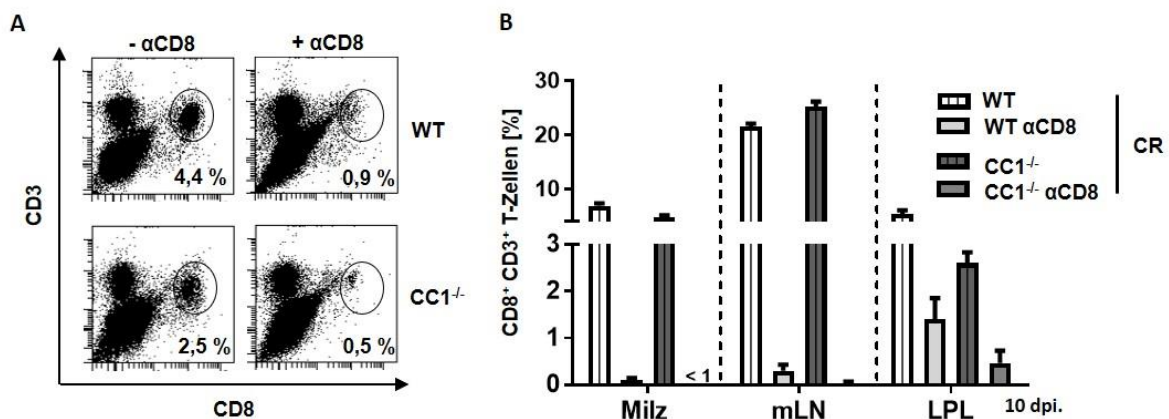


Abbildung 4 15: Einfluss von CD8⁺ T-Zellen in *Ceacam1*^{-/-}-Tieren während einer bakteriellen Infektion. Das CD8⁺ T-Zellkompartiment von *Ceacam1*^{-/-} und WT-Tieren wurde, wie in Kap.3.13.2 beschrieben, mit einem αCD8 Antikörper während der Infektion mit CR depletiert. **A)** Exemplarischer Nachweis der Depletion von CD8⁺ T-Zellen über Durchflusszytometrie. **B)** Zusammenfassende Graphik der Depletion im Kolon, mLN und der Milz. Im Balkendiagramm sind die Mittelwerte als ± SEM angegeben. **CR:** Citrobacter rodentiu; **WT:** Wildtyp; **CC1^{-/-}:** *Ceacam1*^{-/-}; **dpi.:** days post-infection.

Zunächst wurden die Auswirkungen der CD8⁺ T-Zell-Depletion auf die bakterielle Last im Faeces der Tiere 10 dpi untersucht. Wie in vorherigen Experimenten bereits gezeigt, konnte erneut eine erhöhte KBE im Faeces infizierter *Ceacam1*^{-/-}-Tiere bestätigt werden, allerdings hatte die Depletion der CD8⁺ T-Zellen keinen Einfluss auf die KBE im Faeces der beiden Gruppen im Vergleich zu jenen die keinen Antikörper

erhielten (**Abb. 4-16, A**). Interessanterweise fällt auf, dass das Milzgewicht eine rückläufige Tendenz in der *Ceacam1*^{-/-} und αCD8-AK behandelten Gruppe ($218,8 \pm 31,85$ mg) im Vergleich zu den unbehandelten *Ceacam1*^{-/-}-Tieren ($272,2 \pm 42,03$ mg) aufwies (**Abb. 4-16, B**). In Übereinstimmung dazu zeigten auch die histologischen Parameter, wie die Kryptlängen, ein signifikant rückläufiges Verhalten in Folge der αCD8-AK Behandlung von *Ceacam1*^{-/-}-Tieren (von initial $264 \pm 9,88$ μm auf $224,1 \pm 13,33$ μm; **Abb. 4-16, C**). Auch das Verhältnis vom Kolongewicht- zur Länge, zeigte eindeutig ein signifikant reduziertes Verhältnis von $6,19 \pm 0,20$ mg/mm auf $4,73 \pm 0,35$ mg/mm bei den *Ceacam1*^{-/-}-Tieren die αCD8-AK Injektionen erhalten haben (**Abb. 4-16, D**). Im Gegensatz dazu konnte kein Einfluss der αCD8-Antikörper Behandlung in der WT-Kontrollgruppe festgestellt werden.

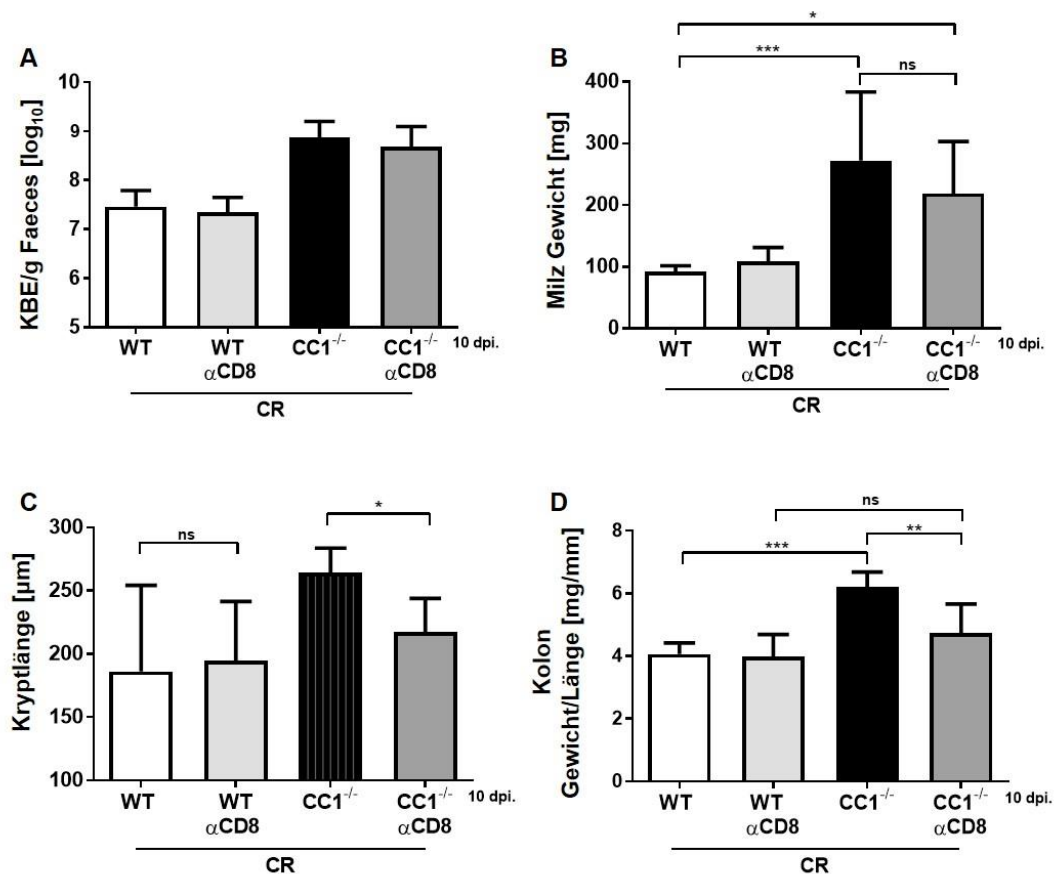


Abbildung 4 16: Einfluss von CD8⁺ T-Zellen in *Ceacam1*^{-/-}-Tieren auf die Pathologie während einer bakteriell induzierten Kolitis. Die markroskopischen Parameter wurden 10 Tage nach der Infektion mit CR aufgenommen. **A)** Zeigt die KBE/g Faeces in logarithmischer Darstellung im Balkendiagramm. **B)** Milzgewicht der *Ceacam1*^{-/-}-WT Tiere in Vergleich zu den αCD8 behandelten Gruppen. **C)** Histologische charakterisierung der Kryptlänge. **D)** Angabe des Verhältnisses vom Kolon-Gewicht zur Länge. Angeben sind die Mittelwerte als \pm SEM aus 2 unabhängigen Versuchen (n=7-10). Die statistischen Signifikanzen wurden über den Student's t-Test oder den One-Way Anova mit anschließender Bonferroni-Korrektur berechnet (*: p < 0,05; **: p < 0,05; *** p < 0,001). WT: Wildtyp; CC1^{-/-}: *Ceacam1*^{-/-}; dpi.: days post-infection.

Zusammenfassend zeigen die beschriebenen Ergebnisse, dass die Defizienz von CEACAM1 in CD8⁺ T-Zellen einen hyperinflammatorischen Phänotyp induziert. Im Modell der bakteriell-induzierten Kolitis durch *C. rodentium* scheinen diese hyperreaktiven T-Zellen keinen Einfluss auf die bakterielle Last zu haben, aber für die schwere Pathologie in *Ceacam1*^{-/-}-Tieren verantwortlich zu sein.

5 Diskussion

Der Gastrointestinaltrakt (GI) stellt das größte zusammenhängende mukosale Gewebe im menschlichen Organismus dar. Auf Grund seiner Funktion, die in der Verdauung und Resorption von Nahrungsbestandteilen liegt, ist der GI fortlaufend Bestandteilen der Umwelt (z.B.: Nahrungsmittelantigenen und Pathogenen) und einer komplexen Vielfalt an Mikroorganismen ausgesetzt, die einzig über das intestinale Epithel von dem restlichen Organismus separiert werden (Blikslager et al. 2007; Podolsky 1999). Daher sind vor allem in diesem sensiblen System biochemische, mechanische und immunregulatorische Mechanismen für den Erhalt der intestinalen Homöostase von zentraler Bedeutung (vergl. **Kap. 1.1.1** und **1.1.2**).

Von den Mitgliedern der großen Familie der Carcinoembryonalen Antigene (CEA), weist CEACAM1 das breiteste Expressionsprofil im Wirbeltierorganismus auf. In den letzten 50 Jahren seit seiner Entdeckung konnte CEACAM1 in diversen Epithelien und Endothelien aber auch in Zellen des Immunsystems nachgewiesen werden, so auch im intestinalen Epithel, zuletzt von Leung und Zalazali gezeigt (Leung et al. 2006b; Zalazali et al. 2008). In Einklang mit vorangegangenen Studien konnte auch in der vorliegenden Arbeit eine konstitutive Expression von CEACAM1 in den apikalen, dem Lumen zugewandten Bereichen über fluoreszenzmikroskopische Analysen gezeigt werden (**Abb. 4.1, B**). Ferner wurde eine differentielle Expression von CEACAM1 sowohl auf CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen unter Homöostase in C57BL/6-Mäusen (WT-Mäusen) in Übereinstimmung mit der Literatur nachgewiesen (**Abb. 4.1, A und C**) (Yu et al. 2006; Möller et al. 1996; Kammerer et al. 1998). Resultierend aus diesen initialen, deskriptiven Ergebnissen wurde in dieser Arbeit erstmals die Rolle von CEACAM1 in dem physiologischen Mausmodell der *Citrobacter rodentium* (*C. rodentium*) induzierten Kolitis untersucht (**Kap. 1.4.1**). Die Infektion von CEACAM1-defizienten Tieren mit *C. rodentium* führte dabei im Vergleich zur Infektion von WT-Tieren zu einer stärkeren Kolonisierung des intestinalen Epithels, das in einer massiv verstärkten Pathophysiologie mit systemischem Verlauf mündete (**Abb. 4-4, A-D**). Der schwere Infektionsverlauf lässt auf eine regulatorische Funktion von CEACAM1 in der Abwehr von pathogenen Mikroorganismen im intestinalen Epithel schließen, die sowohl über die Modulation der intestinalen Permeabilität, als auch des intestinalen Immunsystems induziert werden könnte. Diese Hypothese konnte im Rahmen der Arbeit durch Infektionsexperimente mit Knochenmarkchimären unterstützt werden, die belegen, dass sowohl das hämatopoetische als auch das nicht-hämatopoetische Kompartiment

an der erhöhten Suszeptibilität der *C. rodentium* Infektion in CEACAM1-defizienten Tieren beteiligt sind. Es konnte gezeigt werden, dass vor allem die systemische Verbreitung von *C. rodentium* anhand der Kolonisierung der Leber vom hämatopoetischen Kompartiment vermittelt, die pathologische Veränderung der Milz hingegen, vermutlich ein Resultat des nicht-hämatopoetischen Kompartimentes sein könnten (**Abb. 4-7, C und D**). Weiterhin konnte in WT-Mäusen als Reaktion auf den bakteriellen Stimulus keine Induktion von CEACAM1 auf Protein-oder mRNA-Ebene festgestellt werden (**Abb. 4-2**). In Übereinstimmung mit diesen Resultaten wiesen *in vitro* Studien von Ou und Kollegen mit Hilfe der Kolonkarzinom Zelllinien T84 und Caco-2 keine Induktion humaner CEACAM-Proteine als Reaktion auf bakterielle Stimuli, wie zum Beispiel *Escherichia coli* oder *Salmonella typhimurium*, auf mRNA-Ebene nach (Ou et al. 2009). Dabei scheint eine Induktion jedoch abhängig von der jeweiligen Bakterien-Spezies zu sein, denn es konnte in Zusammenhang mit der Erkrankung COPD im Jahr 2013 in der Gruppe um Klaile und Kollegen eine erhöhte Expression von hCEACAM1 in Folge von *Neisseria* jedoch keine von hCEACAM5 und 6 als Reaktion auf *Moraxella catarrhalis* über immunohistochemische Analysen nachgewiesen werden (Klaile et al. 2013)

5.1 CEACAM1 und die Regulation der intestinalen Permeabilität

Studien von Guttman und Kollegen belegten bereits, dass die Infektion mit *C. rodentium* zu Veränderungen der intestinalen Permeabilität in Regionen der direkten Penetration der IEZ führt, die vornehmlich die Formation der TJs betreffen (Guttman et al. 2006a; Guttman et al. 2006b). Anhand von immunohistochemischen Analysen konnten sie eine *C. rodentium* vermittelte Reorganisation von Claudin 1, 3 und 4 nachweisen (Guttman et al. 2006a). Die intestinale Barriere zeigt auch im humanen System v.a. in CED-Patienten eine erhöhte Durchlässigkeit. Dabei gibt es unterschiedliche Theorien, ob eine erhöhte intestinale Permeabilität ein primärer oder sekundärer Faktor in der Ätiologie von CED sein könnte und weitere Studien sind dringend erforderlich, um diesen Aspekt näher zu untersuchen (vergl. **Kap. 1.3.1.2**) (Benjamin 2008; Hollander et al. 1986; Teahon et al. 1992). In der vorliegenden Arbeit wurde eine erhöhte Permeabilität sowohl in gesunden *Ceacam1*^{-/-}-Tieren als auch in *C. rodentium* infizierten Tieren festgestellt (**Abb. 4-8, A und B**). Zusätzlich zeigen *Ceacam1*^{-/-}-Tiere eine höhere systemische Verteilung der Bakterien im Organismus, in dessen Folge eine erhebliche Kolonisierung der Leber erfolgte (**Abb. 4-4, B**). TJs regulieren die parazelluläre Permeabilität hauptsächlich über zwei Transportrouten.

Zum einen über den *leak-pathway*, der einen Transport von größeren Soluten wie Proteinen oder bakteriellen Bestandteilen (z.B. Lipopolysacchariden, LPS) ladungsunabhängig ermöglicht. Zum anderen können kleine Bestandteile wie Elektrolyte ladungsabhängig über den *Pore-Pathway* zwischen den einzelnen Epithelzellen transportiert werden (Anderson und van Itallie 2009). Untersuchungen im Modell der EPEC-induzierten Kolitis konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass die Bakterien möglicherweise über eine Reorganisation der TJs die intestinale Barriere überwinden können (Li et al. 2008). Auch die lokalen Veränderungen des Zytokin-Milieus, wie zum Beispiel in den ansteigenden Konzentrationen von TNF- α oder aber IFN- γ , in **Abb. 4-6, B und C** zusammengefasst, weisen in der vorliegenden Arbeit auf eine erhöhte Durchlässigkeit des intestinalen Epithels in Folge einer Reorganisation der TJs hin. So sind diese Zytokine als charakteristisches Merkmal einer aktiven CED in Verbund mit einer erhöhten Permeabilität beschrieben worden (Chen und Sundrud 2016). Wichtige strukturelle Bestandteile von TJs sind Mitglieder der Claudin Protein-Familie. Derzeit sind 26 Mitglieder im menschlichen Organismus beschrieben (Garcia-Hernandez et al. 2017). Für viele Claudine konnte dabei ein gewebsspezifisches Expressionsprofil festgestellt werden (Milatz et al. 2010). Die Zusammensetzung der unterschiedlichen Claudine innerhalb der TJs ist sehr spezifisch und variabel, worüber sie maßgeblich die Eigenschaften der intestinalen Permeabilität regulieren. Es können abdichtende und durchlässige Claudin-Verbindungen voneinander unterschieden werden (Zeissig et al. 2007). Claudin-3 wird in vielen unterschiedlichen Epithelien, vor allem aber dem Kolon, exprimiert und zählt zu den abdichtenden Claudinen (Capaldo und Nusrat 2015). Kürzlich konnten Studien zeigen, dass eine Überexpression von Claudin-3 *in vitro* zu einer verringerten intestinalen Permeabilität beitragen kann. Dies geschieht vermutlich über die Reduktion von diskontinuierlichen TJ-Formationen (Milatz et al. 2010). Auch in dem Modell der *C. rodentium* induzierten Kolitis konnten Guttman und Kollegen über immunohistochemische Untersuchungen eine Reorganisation der TJs zeigen, wobei dieser Effekt vermutlich unabhängig von der Expression von Claudin-3 auftrat (Guttman et al. 2006). Auch in den Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit konnte zwischen CEACAM1-defizienten und WT-Tieren keine Veränderung in der Expression von Claudin-3 auf mRNA-Ebene detektiert werden (**Abb. 4-9, A**). Um in anschließenden Experimenten im Modell der *C. rodentium* induzierten Kolitis detaillierteren Einblick in die TJ-Formation zu bekommen, könnten beispielsweise weiterführende Untersuchungen von Claudin-2 von Interesse sein, da es im humanen wie auch murinen System ein breites

Expressionsprofil aufweist und ebenfalls zu den abdichtenden Claudinen gehört. Claudin-2 hat auch eine klinische Bedeutung für das Krankheitsbild der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED). So wurde in Morbus Chron (MC) Patienten oder über *in vitro* Studien durch die Stimulation von TNF- α eine erhöhte Claudin-2 Expression detektiert. Als Resultat wurde ein erhöhter Kationen-Fluss verbunden mit einer *leak-flux* Diarrhöe sowie diskontinuierlicher TJ-Formation beschrieben (Zeissig et al. 2007). Auch in Zusammenhang mit Proteinen der CEA-Superfamilie zeigten Studien, durchgeführt an CEABAC10-Mäusen, die transgen für humanes CEACAM3, 5, 6 und 7 sind, eine Kolonisierung von adherent-invasiven *E. coli* Bakterien (AIEC) über eine erhöhte Expression von Claudin-2 (Carvalho et al. 2009). In dieser Studie konnte eine erhöhte Translokation von Fluorescein-markierten Dextran-Beads in AIEC-infizierten CEABAC10-Mäusen detektiert werden, die auf eine diskontinuierliche Funktion von TJs am Zusammenhalt der physikalischen Barriere des intestinalen Epithels hinweisen (Denizot et al. 2012). Ferner zeigen MC Patienten in Phasen der Remission eine abnormale Expression von CEACAM6, die kurz vor Einsetzen eines erneuten Entzündungsschubes deutlich ansteigt (Barnich et al. 2007).

Die Funktion von Occludin bei der Regulation der intestinalen Permeabilität wird bis heute kontrovers diskutiert. Über *In vitro* und *in vivo* Analysen wurde bereits gezeigt, dass eine proteolytische Spaltung von Occludin in einer erhöhten parazellulären Permeabilität resultieren kann (Wan et al. 1999). In Kontrast dazu weisen Occludin-defiziente Tiere eine normale Anordnung und Verteilung der TJs und damit eine funktionale intestinale Permeabilität auf (Schulzke et al. 2005). Während der *C. rodentium* induzierten Kolitis konnte im Rahmen dieser Arbeit kein verändertes Expressionsprofil von Occludin in Folge der CEACAM1-Defizienz nachgewiesen werden, sodass abschließend auch hier weitere Untersuchungen erfolgen müssten.

Die Zona occludens Proteine (ZO), dienen in erster Linie der korrekten Verankerung der TJs im intestinalen Epithel, indem sie den Kontakt zum Aktin-Cytoskelett vermitteln (Poritz et al. 2007). Interessanterweise wurde im Verlauf einer DSS-Kolitis eine Abnahme der ZO-1 Expression, einhergehend mit einer erhöhten intestinalen Permeabilität, bereits vor den ersten histologischen Veränderungen, nachgewiesen (Poritz et al. 2007). Diese Ergebnisse stehen in starkem Kontrast zu den hier erhobenen Daten, in denen weder für ZO-1 noch für ZO-2 auf mRNA-Ebene eine Regulation im Modell der bakteriell-induzierten Kolitis festzustellen war (**Abb. 4-9, C und D**). Ein möglicher Erklärungsansatz könnte in der Vielfältigkeit der unter-

schiedlichen TJ-Proteine zu finden sein, so dass ein Screening weiterer Proteine eine vielversprechende Ergänzung sein könnte. Post-transkriptionelle Veränderungen könnten ebenfalls für das Modell der *C. rodentium* induzierten Kolitis von entscheidender Bedeutung sein und möglicherweise bei *Ceacam1*^{-/-}-Tieren die erhöhte Permeabilität des intestinalen Epithels erklären.

Direkt unterhalb der apikal gelegenen TJs befindet sich ein weiterer Proteinkomplex, bekannt als AJ. Neben ihrer Funktion Zell-Zell Verbindungen in der lateralen Membran zu vermitteln, halten sie die Zellpolarität aufrecht, regulieren die Migration und Proliferation von intestinalen Epithelzellen und unterstützen die Formierung weiterer Zell-Zell Verbindungen, wie z.B. Desmosomen (vgl. **Kap. 1.1.1**). Das zentrale Transmembranprotein von AJs ist *Epithelial*-Cadherin (E-Cadherin). Intrazellulär agiert die cytoplasmatische Domäne von E-Cadherin mit β -Catenin oder p120-Catenin und vermittelt darüber den Kontakt mit dem Zytoskelett über Aktin und Aktin-assoziierte Proteine (Han und Yap 2012). E-Cadherin wurde vielfach mit einer erhöhten intestinalen Permeabilität, in Folge seiner reduzierten Expression entlang von Ulzerationen im Kontext von CED, beschrieben (Karayiannakis et al. 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte hingegen keine Reduktion, sondern eine Induktion von E-Cadherin in *Ceacam1*^{-/-}-Tieren detektiert werden (**Abb. 4-9, E**). Eine erhöhte E-Cadherin Expression kann auf aktive Regenerationsmechanismen in *Ceacam1*^{-/-}-Tieren hinweisen, um den extensiven Gewebsschäden entgegenzuwirken (Hwang et al. 2012). In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnten Studien im Jahr 2015 belegen, dass im Zuge einer DSS-induzierten Kolitis, das Regenerationsvermögen von Caco-2 Zellen durch exogen appliziertes CEACAM1 signifikant verbessert werden konnte und den Zusammenhalt des intestinalen Epithels positiv beeinflusste (Jin et al. 2016). Daher könnte E-Cadherin möglicherweise in zukünftigen Experimenten als zusätzlicher Parameter für die Intensität einer bakteriell-induzierten Kolitis dienen.

Sowohl für AJ als auch TJ, die zusammen den *apical-junctional*-Komplex bilden, sind Prozesse der Internalisierung über Endozytose beschrieben. Bei diesen post-transkriptionellen Modifikationen kann zwischen physiologischer Internalisierung (Matsuda et al. 2004; Izumi et al. 2004; Le et al. 1999), selektiver Internalisierung von TJ-Proteinen oder aber Internalisierung beider Proteinkomplexe unterschieden werden (Naydenov et al. 2012). Die beiden zuletzt genannten haben Auswirkungen auf die Organisation des intestinalen Epithels und dem Folgend auf die intestinale Permeabilität. Dieses Phänomen könnte die konstante Expression der analysierten TJ-

Proteine auf mRNA-Ebene, entgegen der beschriebenen Resultate, erklären. Daher sind anschließende fluoreszenzmikroskopische Analysen denkbar, um Einblicke in die Lokalisation der AJK-bildenden Proteine im intestinalen Epithel von *Ceacam1^{-/-}*-Tieren im Vergleich zu WT-Kontrollen zu erhalten. Des Weiteren sind Prozesse der Internalisierung über Endozytose vermittelt und unter dem Begriff *Restitution* bekannt. Dieser dynamische Prozess ist Zytokin-vermittelt, wobei hauptsächlich TGF- β und CXCL12 eine Rolle in der lateralen Lokalisation von E-Cadherin zu besitzen scheinen (Hwang et al. 2012).

Des Weiteren ist das intestinale Epithel von einer viskosen Muzin-Schicht bedeckt, in der neben diversen Muzin-Glykoproteinen, slgAs auch AMPs gelöst vorliegen (**Kap. 1.1.1**). AMPs, dienen der Abwehr von Pathogenen. Zu bekannten AMPs zählen α und β - Defensine, Cathelicidine und Lysozyme (Lai und Gallo 2009). Defensine werden im murinen und humanen Organismus von intestinalen Paneth-Zellen sezerniert, die vornehmlich im Dünndarm zu finden sind, jedoch auch einen geringen Anteil der spezialisierten Epithelzellen im Kolon ausmachen (Tanaka et al. 2001). Mechanistisch formen α -Defensine Mikroporen in der bakteriellen Zellwand und führen letztendlich zum Zelltod. Ferner sind α -Defensine im intestinalen Milieu stabil gegenüber proteolytischer Spaltung, so konnte funktionelles α -Defensin auch im Kolon nachgewiesen werden (Mastroianni und Ouellette 2009). Im humanen GI sind hauptsächlich α -Defensin 5 (HD5) und HD6 beschrieben worden (Wehkamp et al. 2005). Im Mausorganismus werden α -Defensine, auch unter dem Begriff Cryptdine zusammengefasst. Die Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen eine signifikante Reduktion von α -Defensin 5 in *Ceacam1^{-/-}*-Tieren als Reaktion auf die *C. rodentium* induzierte Kolitis. Diese könnte möglicherweise den Kontakt zwischen den Bakterien und den IEZ erleichtern und die Zunahme der intestinalen Permeabilität erklären (**Abb. 4-9, G**). Mechanistisch induziert die Metalloproteinase-7 (MMP7) Konformationsänderungen der inaktiven pro- α -Defensine in funktionelle α -Defensine. Studien im Mausmodell konnten zeigen, dass MMP7^{-/-}-Mäuse ohne funktionelle α -Defensine anfälliger für eine DSS-induzierte Kolitis sind (Shi et al. 2007). Interessanterweise sind Mäuse, die transgen für das humane α -Defensin 5 (HD5) sind, resistent gegenüber einer *S. typhimurum* Infektion (Salzman et al. 2003). Des Weiteren zeigen Mäuse denen exogen HD5 appliziert wurde eine reduzierte Mortalität gegenüber einer DSS-induzierten Kolitis (Ishikawa et al. 2010). Generell ist ein Mechanismus denkbar, in dem auf Grund der fehlenden CEACAM1 Expression die

Sekretion von α -Defensin 5 beeinträchtigt wird, die wiederum einen höheren Kontakt zwischen intestinaler Barriere und Kommensalen bzw. Pathobionten begünstigen könnte. Als Konsequenz wäre eine erhöhte intestinale Permeabilität denkbar, die letztlich in einer höheren Pathologie, induziert durch massive Immunreaktionen, endet. Auf Grund der Expression von CEACAM1 auf der apikalen Oberfläche von IEZ in direktem Kontakt zu der dichten inneren Muzin-Schicht, in der ebenfalls die antimikrobiellen α -Defensine lokalisiert sind, wäre ferner eine Funktion von CEACAM1 als antimikrobielles Peptid bzw. der Regulation der intestinalen Kolonisierung denkbar (Leusch et al. 1991; Sauter et al. 1993). Für diese Hypothese spricht die Expression von hCEACAM5 und hCEACAM6 zusammen mit Muzin-Glykoproteinen durch Goblet-Zellen (Hammarstrom und Baranov 2001). Des Weiteren ist bekannt das CEACAM1 neben hCEACAM3, hCEACAM5 und hCEACAM6 als Pathogenrezeptoren fungieren können. So nutzen zum Beispiel Opa-exprimierende *Neisseria*, kommensale *Neisseria*-Spezies oder *Haemophilus influenzae* Viren die Bindung an CEA-Proteine, um das Immunsystem des Wirtes zu umgehen und eine Kolonisierung zu erleichtern (Virji et al. 1999; Virji et al. 2000; Billker et al. 2000; Muenzner et al. 2000). Ein interessanter Aspekt ist ebenfalls der Einfluss des Immunsystems auf die intestinale Permeabilität. So ist bekannt, dass die pro-inflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF- α die intestinale Barriere vornehmlich über die Reorganisation von TJ-Proteinen schwächen können (Ou et al. 2009; Bruewer et al. 2003). Eben diese Zytokine induzieren hingegen im genetisch unveränderten Organismus die Expression von CEACAM1, in dessen Zuge die Kolonisierung einiger Bakterien erleichtert wird. Dies könnte jedoch auch ein potenzieller Schutz- bzw. Abwehrmechanismus gegen noch unbekannte Bakterien sein. Des Weiteren wurde gezeigt, dass im Zuge einer bakteriellen Infektion hCEACAM3 exprimierende Neutrophile die Phagozytose von Opa-exprimierenden Bakterien bewerkstelligen (Sarantis und Gray-Owen 2007). Ebenso wurde für hCEACAM1 beschrieben, dass es indirekt über die Induktion einer oxidativen Stressreaktion in Neutrophilen eine Abwehr der Bakterien induzieren kann (Muenzner et al. 2008).

5.2 CEACAM1 und das adaptive Immunsystem

In diesem Kapitel wird der Einfluss von CEACAM1 auf das adaptive Immunsystem diskutiert, wobei der Fokus primär auf das T-Zellkompartiment gelegt wird. Bereits seit langem ist bekannt, dass CEACAM1 im Zuge einer CED erhöht exprimiert wird. Ferner wird ihm eine zentrale Rolle bei der Tumorgenese zugeschrieben u.a. auch von

Kolonkarzinomen (**Kap. 1.2.1**) (Leung et al. 2008; Horst und Wagener 2004; Zhou et al. 2017). In beiden Krankheitsbildern übernimmt das adaptive Immunsystem eine zentrale Rolle bei der Pathogenese. Charakteristisch für eine aktive CED ist zum Beispiel der Toleranzverlust gegenüber der kommensalen Mikroflora, gefolgt von einer disruptiven Reaktion des intestinalen Immunsystems. Dabei konnten vor allem CD4⁺ T-Effektorzellen des T_H1 und T_H17 Subtyps, die in die intestinale Mukosa einwandern, beschrieben werden (Neurath 2014). Auch das physiologische Modell der *C. rodentium* induzierten Kolitis ist von einer starken CD4⁺ T-Zellantwort geprägt (**Kap. 1.4.1**) (Lis M. Higgins et al. 1999; Symonds et al. 2009).

Im Speziellen induziert die Infektion mit dem gram-negativen nicht-invasiven Mauspathogen ein T_H1 Zytokin-Milieu, charakterisiert über eine erhöhte IL-1, TNF- α , IL-12 und IFN- γ Signatur (Lis M. Higgins et al. 1999). Des Weiteren konnten später Symonds und Kollegen anhand des erhöhten TNF- α , IL-6 und IL-17A Zytokinprofils, bei gleichzeitig reduziertem IL-4 Level, eine Induktion der T_H17-Zellen zum Zeitpunkt der maximalen bakteriellen Belastung zeigen (Symonds et al. 2009). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine starke Induktion von T_H1 und T_H17-Zellen, gemessen anhand der erhöhten Expression von IFN- γ und IL-17A detektiert werden. (**Abb. 4-10, B-E**). Der Vergleich zwischen infizierten *Ceacam1*^{-/-} - und WT-Tieren, zeigte zum Zeitpunkt der *Peak*-Infektion jedoch keine Unterschiede in der CD4⁺ Effektor-T-Zell-vermittelten Immunantwort zwischen *Ceacam1*^{-/-} und WT-Mäusen, sodass ein funktionelles Kompartiment von CD4⁺ T-Zellen auch in Abwesenheit von CEACAM1 im *C. rodentium* induzierten Kolitis-Modell angenommen werden kann. CEACAM1 wird sowohl im humanen als auch im Mausorganismus als einziges Mitglied der CEA-Familie nach Aktivierung des TZR-CD3 Komplexes von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen exprimiert (Kammerer et al. 1998; Möller et al. 1996; Morales et al. 1999; Nakajima et al. 2002). Bisherige Studien der adaptiven Immunantwort wurden im Mausmodell der chemisch-induzierten Kolitis durchgeführt und beschäftigten sich auf Grund ihrer zentralen Rolle im Krankheitsbild der CED, primär mit der Analyse des CD4⁺ T-Zellkompartimentes. Während der Hapten-induzierten Kolitis, sowohl im TNBS- als auch im Oxazolone Modell, übernimmt CEACAM1 vermutlich die Funktion eines co-inhibitorischen Rezeptors. Dabei wurde gezeigt, dass die homophile Interaktion von CEACAM1, experimentell durch die Verwendung eines monoklonalen anti-CEACAM1 Antikörpers oder über ein Fc-Fusionsprotein nachgestellt, (beide spezifisch für die N-Domäne) vor allem die Sekretion von T_H1-Zytokinen und T_H1-

vermittelten Signalwege inhibiert und damit zur Prävention der Immunpathologie führen könnte (Chen et al. 2004; Nagaishi et al. 2006). Des Weiteren zeigen die genannten Studien, dass diese Effekte durch die lange cytoplasmatische Domäne von CEACAM1 vermittelt werden. So induzierte der Transfer von naiven CD4⁺ T-Zellen in CEACAM1-L oder CEACAM1-4L überexprimierenden Mäusen keine Anzeichen einer Kolitis (Nagaishi et al. 2006). Generell zeigen diese Studien zusammen äußerst überzeugend den Einfluss von CEACAM1 auf das CD4⁺ T-Zellkompartiment.

Neben CD4⁺ T-Zellen, wird die Expression von CEACAM1 auch auf der Oberfläche von intestinalen CD8⁺ T-Zellen in Folge ihrer Aktivierung induziert (Donda et al. 2000). Bezüglich der Funktion von CEACAM1 auf intestinalen CD8⁺ T-Zellen liegen bis heute nur wenige Studien vor. Bisherige Untersuchungen beschäftigten sich bisher hauptsächlich mit der Funktion von dysfunktionalen CD8⁺ T-Zellen (auch unter *T-cell exhaustion* bekannt) in Zusammenhang mit diversen Tumorerkrankungen. Dabei scheint die Expression von CEACAM1 auf zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen abhängig vom Entwicklungsstadium der Tumore zu variieren. So weisen frühe Stadien von diversen Tumoren eine reduzierte Expression von CEACAM1 auf, wohingegen in späten Stadien von Adenomen und Karzinomen sowie metastasierenden Tumoren eine erhöhte Expression von CEACAM1 festgestellt werden konnte (Leung et al. 2006a; Ieda et al. 2011; Leung et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine Induktion von CEACAM1 auf CD8⁺ T-Zellen während der Infektion mit *C. rodentium* nachgewiesen werden (**Abb. 4-2, D**). Die folgenden Analysen weisen zusammen auf einen deutlich hyper-inflammatorischen Phänotyp des CD8⁺ T-Zellkompartimentes in Abwesenheit von CEACAM1 im Mausorganismus hin. Im Detail weisen *Ceacam1*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen bereits unter homöostatischen Bedingungen eine erhöhte Expression von CD69 sowie GrzB im Vergleich zu WT-Mäusen auf (**Abb.4-11, C und E**). Dabei ist jedoch auf Grund der spezifischen Toleranzmechanismen im GI, durch die kontinuierliche Exposition mit Antigenen, generell eine höhere Expression des Aktivierungsmarkers CD69 physiologisch, wie auch anhand der WT-Kontrollen deutlich wird (Radulovic und Niess 2015). In Reaktion auf den bakteriellen Stimulus konnte in Übereinstimmung mit dem hyper-inflammatorischen Phänotyp eine signifikant höhere Expression von CD69 auf *Ceacam1*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen, vor allem der *Mean Fluorescence Intensity* (MFI), gezeigt werden (**Abb.4-11, D**).

Weiterhin weist die dramatisch reduzierte Expression der inhibitorischen Moleküle PD-1 und CTLA-4 ebenfalls auf einen hyper-inflammatorischen Phänotyp der CD8⁺ T-Zellen in Abwesenheit von CEACAM1 im Mausorganismus hin (**Abb.4-12, A-D**). Anschließende *in vitro* Analysen belegen ebenfalls, durch die verzögerte Expression von PD-1 und gesteigerte Sekretion pro-inflammatorischer Mediatoren (z.B.: IL-6, IL-17A und TNF- α), auf der Zelloberfläche von CEACAM1-defizienten CD8⁺-Splenozyten den genannten Phänotyp der CD8⁺ T-Zellen (**Abb. 4-14, A-D**). Diese Ergebnisse stehen ferner in Einklang mit dem *in vivo* Zytokinprofil nach der Induktion einer bakteriellen Kolitis, in dem ebenfalls eine pro-inflammatorische Signatur detektiert werden konnte (**Abb. 4-6, A-E**). Das im Organismus neben der gesteigerten Expression von IL-6 und TNF- α auch erhöhte IFN- γ und MIP1- α Level, nicht jedoch von IL-17A, detektiert wurden, zeigt die Notwendigkeit generierte Daten aus kontrollierten *in vitro* Bedingungen *in vivo* zu verifizieren. Zusammenfassend spiegelt das Zytokin-Profil der *Ceacam1*^{-/-}-Tiere die prägnanten makroskopischen Parameter einer massiv gesteigerten Pathologie während einer *C. rodentium* induzierten Kolitis wieder.

Die beschriebene simultane Reduktion von PD-1 und CTLA-4 in *Ceacam1*^{-/-}-Tieren könnte ferner auf eine synergistische Funktion von CEACAM1 bezüglich der Expression anderer co-inhibitorischer Rezeptoren hinweisen. In diesem Zusammenhang sind viele Studien aus viralen Infektionen und Tumormodellen bekannt, die den Einfluss von co-inhibitorischen Rezeptoren wie zum Beispiel PD-1 und CTLA-4 aber auch Lag3 und TIM-3, in Zusammenhang mit einem dysfunktionalen Phänotyp von T-Zellen, analysierten (Callahan et al. 2016; Attanasio und Wherry 2016). Ziel der wissenschaftlichen Untersuchungen ist dabei, zukünftig über diese Moleküle Immunantworten für therapeutische Zwecke zu modulieren. Die Verwendung von PD-1 wird bereits in klinischen Studien zur Krebstherapie eingesetzt, und zeigt höhere Überlebensraten. Jedoch birgt die Blockade von Immun-Checkpoint-Inhibitoren Nebenwirkungen im Sinne einer Tumorprogression und zeigen daher noch nicht den erwarteten Erfolg (Robert et al. 2015; Buchbinder und Desai 2016).

Neue Studien untersuchen daher die immunmodulatorischen Möglichkeiten der Inhibition von mehreren *Immune-Checkpoint*-Molekülen gleichzeitig. Bezüglich der Funktion von CEACAM1 konnte im CT26-vermittelten Tumormodell gezeigt werden, dass eine dreifach-positive Population an CD8⁺ T-Zellen (PD-1, Tim-3 und CEACAM1) in die Tumorregionen einwandert. Dabei produzierten sie nur eine geringe Menge an TNF- α und IL-2. Nach simultaner Applikation von anti-TIM-3 und anti-CEACAM1

Antikörpern wurde dieser Phänotyp umgekehrt, wie anhand einer erneuten Produktion von IFN- γ und IL-10 verdeutlicht werden konnte (Huang et al. 2015). Diese Studien geben Anlass für die Hypothese eines synergistischen Effektes von CEACAM1 auf weitere inhibitorische Moleküle. In Übereinstimmung konnte in diesem Jahr auch im humanen System eine positive Korrelation zwischen der Co-Expression des inhibitorischen Moleküls TIM-3 und CEACAM1 in Patienten mit Kolonkarzinomen detektiert werden. Obwohl die Expression von CEACAM1 und TIM-3 auch für sich genommen einen dysfunktionalen Phänotyp in zytotoxischen Tumor-infiltrierenden T-Zellen induzieren konnten, war dieser Effekt deutlich stärker, gezeigt über die reduzierte Expression von IFN- γ , in der Population von CEACAM1⁺TIM-3⁺ CD8⁺ T-Zellen (Zhang et al. 2017). So könnte in weiteren Versuchen ebenfalls die Expression von CTLA-4, in Anlehnung der hier gezeigten *in vitro* Studien (**Abb. 4-13, B**), analysiert werden. Ferner wäre eine *in vivo* Studie über den Einfluss von exogen zugeführtem CEACAM1 auf die Expression weiterer co-inhibitorischer Rezeptoren im Modell der bakteriell-induzierten Kolitis denkbar.

Zusammenfassend zeigen CD8⁺ T-Zellen von *Ceacam1*^{-/-}-Tieren einen hyperinflammatorischen Phänotyp, sodass ein funktionelles CEACAM1-Protein vermutlich auch im Modell der *C. rodentium* Infektion inhibitorisch auf das CD8⁺T-Zellkompartiment wirken könnte. In Einklang mit dieser Hypothese konnte die Depletion von CD8⁺ T-Zellen in *Ceacam1*^{-/-}-Tieren, die makroskopischen Parameter einer *C. rodentium* induzierten Kolitis eindeutig mildern und an jenen von WT-Tieren annähern (**Abb. 4-16, A-D**). Der deutliche Einfluss des CD8⁺ T-Zellkompartimentes in dieser Arbeit ist vor allem in Hinblick auf die Ergebnisse von zwei unabhängigen Studien interessant, die in Wildtyp-Mäusen den Einfluss von CD8⁺ T-Zellen während der *C. rodentium* induzierten Kolitis ausschließen konnten. So konnte festgestellt werden, dass zwischen Mäusen deren CD8⁺ T-Zellkompartiment über die Verwendung eines neutralisierenden monoklonalen anti-CD8 Antikörpers depletiert wurden und jenen ohne Depletion im Infektionsverlauf kein Unterschied in der Pathophysiologie bestand (Simmons et al. 2003). In einer weiteren Studie zeigten sowohl Mäuse mit einem CD8⁺ T-Zell Knock-Out und WT-Mäuse eine gleichartige Reaktion auf den bakteriellen Stimulus (Bry und Brenner 2004b). Im Einklang mit diesen Studien, konnte auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass für die WT-Mäuse eine Depletion von CD8⁺ T-Zellen keinen Einfluss auf die Pathophysiologie in dem Modell der *C. rodentium* induzierten Kolitis zu nehmen scheint. Beide Gruppen

waren sowohl in Bezug auf ihre bakterielle Belastung als auch auf ihre physiologische Konstitution nicht voneinander zu unterscheiden (**Abb. 4-16, A-D**).

Die gegensätzlichen Resultate bezogen auf das CD4⁺ T-Zellkompartiment von *Ceacam1*^{-/-} und WT-Tieren im Vergleich zu den Studien von Nagishi und Kollegen könnten möglicherweise über die Betrachtung der verschiedenen Untersuchungsmodelle erklärt werden. So verwendeten sie ein verändertes Modell des adoptiven Zelltransfers von CD4⁺ T-Zellen in Rag^{-/-} Empfängertiere. In diesem wurden die naiven (nicht-aktivierten) CD4⁺ T-Zellen für die Überexpression von CEACAM1-2L über retrovirale Transfektion zuvor mit anti-CD3, anti-CD28 und rIL-2 aktiviert, erneut durchflusszytometrisch angereichert und intraperitoneal injiziert. Modelle der chemisch-induzierten Kolitis induzieren jedoch einen massiven Eingriff auf die intestinale Architektur, woraufhin Untersuchungen der schädigenden T-Zellantworten, die bekanntermaßen bei CED auftreten, erleichtert werden (**Kap. 1.4**). Als Beispiel ist das akute DSS-Modell zu nennen, dessen Induktion weitestgehend unabhängig von der kommensalen Mikroflora möglich ist, wodurch es Analysen nach der initialen Zerstörung der intestinalen Barriere vereinfacht (Valatas et al. 2015). Als Konsequenz der chemisch-induzierten Modelle ist eine differenzierte Betrachtung der einzelnen Komponenten der intestinalen Barriere, wie z.B. der TJs und AJs, schwierig. Im Vergleich dazu, handelt es sich bei dem *C. rodentium* induzierten Kolitis Modell um ein natürliches Mauspathogen. Die Induktion einer Entzündung durch den bakteriellen Stimulus im GI erlaubt Untersuchungen der Interaktionen zwischen Pathogenen und Wirt in einem komplexen und diversen Umfeld. Dadurch konnte in Bezug auf CEACAM1 eine ganzheitliche Betrachtung der Funktion auf die unterschiedlichen hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Kompartimente erfolgen. Neben dem Einfluss von CEACAM1 auf das T-Zellkompartiment wurden dadurch auch Untersuchungen auf B-Zellen und Zellen des angeborenen Immunsystems ermöglicht. Dabei konnte eine normale Immunreaktion zwischen den infizierten CEACAM1-defizienten Tieren im Vergleich zu den WT-Kontrollen detektiert werden.

Zusammenfassend weisen die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass CEACAM1 über seine immunregulatorischen Funktionen möglicherweise an der Pathologie, induziert durch eine *C. rodentium* Infektion, beteiligt ist. Zukünftige Untersuchungen, fokussierend auf die mechanistische Regulation, könnten die Grundlage für neue therapeutische Ansätze besonders für das Krankheitsbild chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen bilden.

6 Zusammenfassung

CEACAM1 stellt auf Grund seiner diversen Expression in Epithelien, Endothelien und Zellen des Immunsystems ein interessantes Molekül in der CEA-Superfamilie dar. Phylogenetische Studien belegen, dass CEACAM1 auf Grund seiner konservierten Expression in über 27 unterschiedlichen Spezies ein zentrales Mitglied dieser Proteinfamilie sein könnte. Das wissenschaftliche Interesse resultiert aus Studien die für CEACAM1 eine Funktion bei immunregulatorischen Prozessen belegen konnten, wodurch weitere Analysen vor allem in Hinblick für die Entwicklung neuer therapeutischer Maßnahmen von besonderem Wert sein könnten. So belegen Untersuchungen für CEACAM1 bei der Tumorgenese, in Abhängigkeit von Art und Stadium des Tumors, ein heterogenes Expressionsprofil oder aber in Zusammenhang mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, eine erhöhte Expression (Morales et al. 1999; Donda et al. 2000; Costello et al. 2005).

In dieser Arbeit erfolgte darauf aufbauend erstmals die funktionelle Analyse von CEACAM1 in dem Modell der bakteriell-induzierten Kolitis. Dabei konnte eine erhöhte Suszeptibilität für die bakteriell-induzierte Kolitis in Folge einer CEACAM1-Defizienz nachgewiesen werden, die sich in einer massiven Pathologie, sowohl auf makroskopischer, als auch histologischer Ebene äußerte. Dabei scheint neben dem hämatopoetischen auch das nicht-hämatopoetische Kompartiment involviert zu sein. In Einklang mit der beachtlichen Expression von CEACAM1 auf intestinalen Epithelzellen und der Funktion der intestinalen Barriere bei der Abwehr von exogenen Pathogenen, konnten Analysen im Rahmen der Arbeit eine erhöhte intestinale Permeabilität in Folge der genetischen CEACAM1-Defizienz nachweisen. Weitere Analysen lassen ferner auf einen möglichen Zusammenhang mit einer reduzierten α -Defensin 5 Expression schließen.

Die durchflusszytometrischen Analysen des hämatopoetischen Kompartimentes zeigten, sowohl in *Ceacam1*^{-/-}-Tieren, als auch WT-Tieren die charakteristische T_H1- und T_H17-vermittelte Immunreaktion nach Infektion mit *C. rodentium*. Entgegen der beschriebenen Funktionen von CEACAM1 auf intestinalen CD4⁺ T-Zellen ist seine Funktion auf intestinalen CD8⁺ T-Zellen nur wenig beschrieben. In der vorliegenden Arbeit konnte daher erstmals ein hyper-inflammatorischer Charakter von CD8⁺ T-Zellen anhand einer erhöhten Expression von CD69, vor allem aber reduzierter

Expression der inhibitorischen Moleküle PD-1 und CTLA-4 in *Ceacam1*^{-/-}-Mäusen, als Reaktion auf *C. rodentium* beschrieben werden.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse in dieser Arbeit darauf hin, dass die Defizienz von CEACAM1 einen modulatorischen Einfluss auf die intestinale Barriere, vermutlich über die Regulation von anti-mikrobiellen Proteinen, in Folge der Infektion mit *C. rodentium* besitzen könnte. Ferner kann der hyper-reaktive Phänotyp von CD8⁺ T-Zellen im Modell der *C. rodentium* induzierten Kolitis möglicherweise für die schwere Pathologie in *Ceacam1*^{-/-}-Tieren verantwortlich sein. Diese Hypothese wird durch die reduzierte Pathologie von *Ceacam1*^{-/-}-Tieren mit depletiertem CD8⁺ T-Zellkompartiment in Folge der Infektion, bestärkt.

6 Summary

CEACAM1, an interesting molecule in the CEA-superfamily shows a diverse expression in epithelia, endothelial and immune cells. Phylogenetic studies have shown that CEACAM1 might be central in this diverse protein family due to its conserved expression in over 27 different species. Increasing scientific interest results from studies that showed beside its function as a cell adhesion molecule a central role in immunoregulatory processes. For example, studies confirmed an inverse expression profile of CEACAM1 during tumorigenesis, depending on the type and stage of the tumors. Furthermore, elevated levels of CEACAM1 during inflammatory bowel diseases (IBD) highlight CEACAM1 as a potential target for the development of new therapeutical interventions (Morales et al. 1999; Donda et al. 2000; Costello et al. 2005).

This thesis deals for the first time with the functional analysis of CEACAM1 in the model of bacterial-induced colitis. Consequence of the CEACAM1 deficiency was an increased susceptibility to *C. rodentium* induced colitis shown by a severe pathology, on both the macroscopic as well as the histological level. In addition to the hematopoietic compartment, the non-hematopoietic compartment appears to be involved. In agreement with the remarkable expression of CEACAM1 on intestinal epithelial cells and the function of the intestinal barrier in the defense of exogenous pathogens, analyzes identified an increased intestinal permeability due to the genetically deleted CEACAM1 expression. Further analyzes also suggest a possible association of CEACAM1 with the expression of antimicrobial peptides shown by the reduced α -defensin 5 expression resulting in its absence.

The flow cytometric analyzes of the CD4⁺ T cell compartment highlight the characteristic T_H1 and T_H17-mediated immune response in both Ceacam1^{-/-} and WT-animals to the infection with *C. rodentium*. In contrast to the reported function of CEACAM1 on intestinal CD4⁺ T cells, obtained from different animal models, however, only a few studies are available concerning the function of CEACAM1 on intestinal CD8⁺ T cells. Interestingly in response to the infection of Ceacam1^{-/-}-mice with *C. rodentium*, CD8⁺ T cells showed in line with an increased CD69 expression, an over all reduced expression of the inhibitory molecules PD-1 and CTLA-4 indicating for a hyper-inflammatory phenotype.

In conclusion, the results of the present work indicate that infection with *C. rodentium* of CEACAM1-deficient mice may have modulatory effect on the intestinal barrier, presumably via regulatory effects on the expression of antimicrobial peptides. Furthermore, the appearance of hyper-reactive CD8⁺ T cells could be responsible for the severe pathology seen in *Ceacam1*^{-/-} animals during the bacterial induced colitis without affecting the bacterial load. This hypothesis is strengthened by the overall reduced pathology occurring in *Ceacam1*^{-/-} mice depleted of CD8⁺ T cells during the *C. rodentium* challenge.

7 Literaturverzeichnis

Ahmed, Ishfaq; Chandrakesan, Parthasarathy; Tawfik, Ossama; Xia, Lijun; Anant, Shrikant; Umar, Shahid (2012): Critical roles of Notch and Wnt/beta-catenin pathways in the regulation of hyperplasia and/or colitis in response to bacterial infection. In: *Infection and immunity* 80 (9), S. 3107–3121.

Ahmed, Rafi; Honjo, Tasuku (Hg.) (2011): Negative Co-Receptors and Ligands. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg (Current Topics in Microbiology and Immunology, 350).

Ananthakrishnan, Ashwin N. (2015): Epidemiology and risk factors for IBD. In: *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 12 (4), S. 205–217.

Ananthakrishnan, Ashwin N.; Higuchi, Leslie M.; Huang, Edward S.; Khalili, Hamed; Richter, James M.; Fuchs, Charles S.; Chan, Andrew T. (2012): Aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drug use, and risk for Crohn disease and ulcerative colitis. A cohort study. In: *Annals of internal medicine* 156 (5), S. 350–359.

Ananthakrishnan, Ashwin N.; Khalili, Hamed; Konijeti, Gauree G.; Higuchi, Leslie M.; Silva, Punyanganie de; Korzenik, Joshua R. et al. (2013): A prospective study of long-term intake of dietary fiber and risk of Crohn's disease and ulcerative colitis.

Anderson, James M.; van Itallie, Christina M. (2009): Physiology and function of the tight junction. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1 (2), a002584.

Annunziato, Francesco; Cosmi, Lorenzo; Santarlasci, Veronica; Maggi, Laura; Liotta, Francesco; Mazzinghi, Benedetta et al. (2007): Phenotypic and functional features of human Th17 cells. In: *J Exp Med* 204 (8), S. 1849–1861.

Assimakopoulos, Stelios F.; Papageorgiou, Ismini; Charonis, Aristidis (2011): Enterocytes' tight junctions: From molecules to diseases. In: *World journal of gastrointestinal pathophysiology* 2 (6), S. 123–137.

Atarashi, Koji; Honda, Kenya (2011): Microbiota in autoimmunity and tolerance. In: *Current Opinion in Immunology* 23 (6), S. 761–768.

Attanasio, John; Wherry, E. John (2016): Costimulatory and Coinhibitory Receptor Pathways in Infectious Disease. In: *Immunity* 44 (5), S. 1052–1068.

Bain, C. C.; Scott, C. L.; Uronen-Hansson, H.; Gudjonsson, S.; Jansson, O.; Grip, O. et al. **(2013)**: Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. In: *Mucosal immunology* 6 (3), S. 498–510.

Bain, Calum C.; Bravo-Blas, Alberto; Scott, Charlotte L.; Gomez Perdiguero, Elisa; Geissmann, Frederic; Henri, Sandrine et al. **(2014)**: Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. In: *Nature immunology* 15 (10), S. 929–937.

Balda, M. S. **(1996)**: Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical- basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. In: *The Journal of cell biology* 134 (4), S. 1031–1049.

Barnich, Nicolas; Carvalho, Frédéric A.; Glasser, Anne-Lise; Darcha, Claude; Jantscheff, Peter; Allez, Matthieu et al. **(2007)**: CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive E. coli, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. In: *The Journal of clinical investigation* 117 (6), S. 1566–1574.

Barreau, F.; Hugot, J. P. **(2014)**: Intestinal barrier dysfunction triggered by invasive bacteria. In: *Current opinion in microbiology* 17, S. 91–98.

Barthold, S. W.; Coleman, G. L.; Jacoby, R. O.; Livestone, E. M.; Jonas, A. M. **(1978)**: Transmissible murine colonic hyperplasia. In: *Veterinary pathology* 15 (2), S. 223–236.

Baumgart, Daniel C.; Sandborn, William J. **(2012)**: Crohn's disease. In: *The Lancet* 380 (9853), S. 1590–1605.

Bazzoni, G.; Martinez-Estrada, O. M.; Mueller, F.; Nelboeck, P.; Schmid, G.; Bartfai, T. et al. **(2000)**: Homophilic interaction of junctional adhesion molecule. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (40), S. 30970–30976.

Bazzoni, Gianfranco **(2003)**: The JAM family of junctional adhesion molecules. In: *Current Opinion in Cell Biology* 15 (5), S. 525–530.

Beauchemin, Nicole; Arabzadeh, Azadeh **(2013)**: Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs) in cancer progression and metastasis. In: *Cancer metastasis reviews* 32 (3-4), S. 643–671.

Benjamin, Jaya (2008): Intestinal permeability and its association with the patient and disease characteristics in Crohn's diseases. In: *World journal of gastroenterology* 14 (9), S. 1399.

Bennett, F.; Luxenberg, D.; Ling, V.; Wang, I.-M.; Marquette, K.; Lowe, D. et al. (2003): Program Death-1 Engagement Upon TCR Activation Has Distinct Effects on Costimulation and Cytokine-Driven Proliferation. Attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, But Not CD28, IL-7, and IL-15 Responses. In: *The Journal of Immunology* 170 (2), S. 711–718.

Berg, D. J.; Davidson, N.; Kuhn, R.; Muller, W.; Menon, S.; Holland, G. et al. (1996): Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4 (+) TH1-like responses. In: *The Journal of clinical investigation* 98 (4), S. 1010–1020.

Bevins, Charles L.; Salzman, Nita H. (2011): Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. In: *Nature reviews. Microbiology* 9 (5), S. 356–368.

Bhattacharyya, Asima; Chattopadhyay, Ranajoy; Mitra, Sankar; Crowe, Sheila E. (2014): Oxidative stress. An essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. In: *Physiological reviews* 94 (2), S. 329–354.

Biancone, L.; Monteleone, I.; Del Vecchio Blanco, G.; Vavassori, P.; Pallone, F. (2002): Resident bacterial flora and immune system. In: *Digestive and Liver Disease* 34, S37-S43.

Billker, O.; Popp, A.; Gray-Owen, S. D.; Meyer, T. F. (2000): The structural basis of CEACAM-receptor targeting by neisserial Opa proteins. In: *Trends in microbiology* 8 (6), 258-60; discussion 260-1.

Biswas, Subhra K.; Mantovani, Alberto (2010): Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. In: *Nature immunology* 11 (10), S. 889–896.

Blackburn, Shawn D.; Shin, Haina; Haining, W. Nicholas; Zou, Tao; Workman, Creg J.; Polley, Antonio et al. (2008): Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. In: *Nat Immunol* 10 (1), S. 29–37.

Blair, Stephanie A.; Kane, Sunanda V.; Clayburgh, Daniel R.; Turner, Jerrold R. (2006): Epithelial myosin light chain kinase expression and activity are upregulated in

inflammatory bowel disease. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 86 (2), S. 191–201.

Blaser, Martin J.; Falkow, Stanley (2009): What are the consequences of the disappearing human microbiota? In: *Nature reviews. Microbiology* 7 (12), S. 887–894.

Blikslager, Anthony T.; Moeser, Adam J.; Gookin, Jody L.; Jones, Samuel L.; Odle, Jack (2007): Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. In: *Physiological reviews* 87 (2), S. 545–564.

Boirivant, Monica; Fuss, Ivan J.; Chu, Alan; Strober, Warren (1998): Oxazolone Colitis. A Murine Model of T Helper Cell Type 2 Colitis Treatable with Antibodies to Interleukin 4. In: *J Exp Med* 188 (10), S. 1929–1939.

Bonaz, Bruno L.; Bernstein, Charles N. (2013): Brain-gut interactions in inflammatory bowel disease. In: *Gastroenterology* 144 (1), S. 36–49.

Breese, E.; Braegger, C. P.; Corrigan, C. J.; Walker-Smith, J. A.; MacDonald, T. T. (1993): Interleukin-2- and interferon-gamma-secreting T cells in normal and diseased human intestinal mucosa. In: *Immunology* 78 (1), S. 127–131.

Brennan, P. C.; Fritz, T. E.; Flynn, R. J.; Poole, C. M. (1965): *Citobacter freundii* associated with diarrhea in a laboratory mice. In: *Laboratory animal care* 15, S. 266–275.

Bruewer, M.; Luegering, A.; Kucharzik, T.; Parkos, C. A.; Madara, J. L.; Hopkins, A. M.; Nusrat, A. (2003): Proinflammatory Cytokines Disrupt Epithelial Barrier Function by Apoptosis-Independent Mechanisms. In: *The Journal of Immunology* 171 (11), S. 6164–6172.

Bry, L.; Brenner, M. B. (2004): Critical Role of T Cell-Dependent Serum Antibody, but Not the Gut-Associated Lymphoid Tissue, for Surviving Acute Mucosal Infection with *Citrobacter rodentium*, an Attaching and Effacing Pathogen. In: *The Journal of Immunology* 172 (1), S. 433–441.

Buchbinder, Elizabeth I.; Desai, Anupam (2016): CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. In: *American journal of clinical oncology* 39 (1), S. 98–106.

Budt, Matthias; Michely, Beate; Müller, Mario M.; Reutter, Werner; Lucka, Lothar (2002): Secreted CEACAM1 splice variants in rat cell lines and in vivo in rat serum. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 292 (3), S. 749–755.

Callahan, Margaret K.; Postow, Michael A.; Wolchok, Jedd D. (2016): Targeting T Cell Co-receptors for Cancer Therapy. In: *Immunity* 44 (5), S. 1069–1078.

Capaldo, Christopher T.; Nusrat, Asma (2015): Claudin switching: Physiological plasticity of the Tight Junction. In: *Seminars in cell & developmental biology* 42, S. 22–29.

Carvalho, Frédéric A.; Barnich, Nicolas; Sivignon, Adeline; Darcha, Claude; Chan, Carlos H. F.; Stanners, Clifford P.; Darfeuille-Michaud, Arlette (2009): Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. In: *J Exp Med* 206 (10), S. 2179–2189.

Chandrakesan, P.; Roy, B.; Jakkula, L. U. M. R.; Ahmed, I.; Ramamoorthy, P.; Tawfik, O. et al. (2014): Utility of a bacterial infection model to study epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition or tumorigenesis. In: *Oncogene* 33 (20), S. 2639–2654.

Chemnitz, J. M.; Parry, R. V.; Nichols, K. E.; June, C. H.; Riley, J. L. (2004): SHP-1 and SHP-2 Associate with Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif of Programmed Death 1 upon Primary Human T Cell Stimulation, but Only Receptor Ligation Prevents T Cell Activation. In: *The Journal of Immunology* 173 (2), S. 945–954.

Chen, D.; Iijima, H.; Nagaishi, T.; Nakajima, A.; Russell, S.; Raychowdhury, R. et al. (2004): Carcinoembryonic Antigen-Related Cellular Adhesion Molecule 1 Isoforms Alternatively Inhibit and Costimulate Human T Cell Function. In: *The Journal of Immunology* 172 (6), S. 3535–3543.

Chen, Jian; Liao, Meng-yang; Gao, Xing-li; Zhong, Qi; Tang, Ting-ting; Yu, Xian et al. (2013): IL-17A induces pro-inflammatory cytokines production in macrophages via MAPKinases, NF- κ B and AP-1. In: *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 32 (5), S. 1265–1274.

Chen, Mei Lan; Sundrud, Mark S. (2016): Cytokine Networks and T-Cell Subsets in Inflammatory Bowel Diseases. In: *Inflammatory Bowel Diseases* 22 (5), S. 1157–1167.

Chen, WanJun; Jin, Wenwen; Hardegen, Neil; Lei, Ke-Jian; Li, Li; Marinos, Nancy et al. (2003): Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺

regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. In: *J Exp Med* 198 (12), S. 1875–1886.

Chiba, Hideki; Osanai, Makoto; Murata, Masaki; Kojima, Takashi; Sawada, Norimasa (2008): Transmembrane proteins of tight junctions. In: *Biochimica et biophysica acta* 1778 (3), S. 588–600.

Chiodini, Rodrick J.; Chamberlin, William M.; Sarosiek, Jerzy; McCallum, Richard W. (2012): Crohn's disease and the mycobacterioses. A quarter century later. Causation or simple association? In: *Critical reviews in microbiology* 38 (1), S. 52–93.

Coombes, Janine L.; Siddiqui, Karima R. R.; Arancibia-Carcamo, Carolina V.; Hall, Jason; Sun, Cheng-Ming; Belkaid, Yasmine; Powrie, Fiona (2007): A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. In: *J Exp Med* 204 (8), S. 1757–1764.

Cooney, Rachel; Baker, John; Brain, Oliver; Danis, Benedicte; Pichulik, Tica; Allan, Philip et al. (2010): NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. In: *Nature medicine* 16 (1), S. 90–97.

Costello, Christine M.; Mah, Nancy; Hasler, Robert; Rosenstiel, Philip; Waetzig, Georg H.; Hahn, Andreas et al. (2005): Dissection of the inflammatory bowel disease transcriptome using genome-wide cDNA microarrays. In: *PLoS medicine* 2 (8), e199.

Cresswell, Peter; Ackerman, Anne L.; Giodini, Alessandra; Peaper, David R.; Wearsch, Pamela A. (2005): Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. In: *Immunological Reviews* 207, S. 145–157.

Darfeuille-Michaud, Arlette; Boudeau, Jérôme; Bulois, Philippe; Neut, Christel; Glasser, Anne-Lise; Barnich, Nicolas et al. (2004): High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. In: *Gastroenterology* 127 (2), S. 412–421.

Deng, W.; Li, Y.; Vallance, B. A.; Finlay, B. B. (2001): Locus of enterocyte effacement from *Citrobacter rodentium*. Sequence analysis and evidence for horizontal transfer among attaching and effacing pathogens. In: *Infection and immunity* 69 (10), S. 6323–6335.

Denizot, Jeremy; Sivignon, Adeline; Barreau, Frederick; Darcha, Claude; Chan, H. F. Carlos; Stanners, Clifford P. et al. (2012): Adherent-invasive *Escherichia coli* induce

claudin-2 expression and barrier defect in CEABAC10 mice and Crohn's disease patients. In: *Inflammatory Bowel Diseases* 18 (2), S. 294–304.

Denning, Timothy L.; Wang, Yi-chong; Patel, Seema R.; Williams, Ifor R.; Pulendran, Bali (2007): Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. In: *Nature immunology* 8 (10), S. 1086–1094.

Dieleman, L. A.; Arends, A.; Tonkonogy, S. L.; Goerres, M. S.; Craft, D. W.; Grenther, W. et al. (2000): *Helicobacter hepaticus* Does Not Induce or Potentiate Colitis in Interleukin-10-Deficient Mice. In: *Infection and immunity* 68 (9), S. 5107–5113.

Donda, Alena; Mori, Lucia; Shamshiev, Abdijapar; Carena, Ilaria; Mottet, Christian; Heim, Markus H. et al. (2000): Locally inducible CD66a (CEACAM1) as an amplifier of the human intestinal T cell response. In: *Eur. J. Immunol.* 30 (9), S. 2593–2603.

Dveksler, G. S.; Dieffenbach, C. W.; Cardellichio, C. B.; McCuaig, K.; Pensiero, M. N.; Jiang, G. S. et al. (1993): Several members of the mouse carcinoembryonic antigen-related glycoprotein family are functional receptors for the *coronavirus mouse hepatitis virus-A59*. In: *Journal of Virology* 67 (1), S. 1–8.

Ebnet, Klaus; Suzuki, Atsushi; Ohno, Shigeo; Vestweber, Dietmar (2004): Junctional adhesion molecules (JAMs). More molecules with dual functions? In: *Journal of cell science* 117 (Pt 1), S. 19–29.

Eckmann, Lars (2006): Animal models of inflammatory bowel disease: lessons from enteric infections. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1072, S. 28–38.

Elson, Charles O.; Cong, Yingzi; McCracken, Vance J.; Dimmitt, Reed A.; Lorenz, Robin G.; Weaver, Casey T. (2005): Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. In: *Immunological Reviews* 206, S. 260–276.

Ey, B.; Eyking, A.; Gerken, G.; Podolsky, D. K.; Cario, E. (2009): TLR2 Mediates Gap Junctional Intercellular Communication through Connexin-43 in Intestinal Epithelial Barrier Injury. In: *Journal of Biological Chemistry* 284 (33), S. 22332–22343.

Farache, Julia; Koren, Idan; Milo, Idan; Gurevich, Irina; Kim, Ki-Wook; Zigmond, Ehud et al. (2013): Luminal bacteria recruit CD103+ dendritic cells into the intestinal epithelium to sample bacterial antigens for presentation. In: *Immunity* 38 (3), S. 581–595.

Farquhar, M. G. (1963): Junctional complexes in various epithelia. In: *The Journal of cell biology* 17 (2), S. 375–412.

Farrell, Richard J.; LaMont, J. Thomas (2002): Microbial factors in inflammatory bowel disease. In: *Gastroenterology Clinics of North America* 31 (1), S. 41–62.

Fourcade, Julien; Sun, Zhaojun; Benallaoua, Mourad; Guillaume, Philippe; Luescher, Immanuel F.; Sander, Cindy et al. (2010): Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients. In: *J Exp Med* 207 (10), S. 2175–2186.

Frängsmyr, Lars; Baranov, Vladimir; Hammarstrom, S. (1999): Four Carcinoembryonic Antigen Subfamily Members, CEA, NCA, BGP and CGM2, Selectively Expressed in the Normal Human Colonic Epithelium, Are Integral Components of the Fuzzy Coat. In: *Tumor Biol* 20 (5), S. 277–292.

Frank, Daniel N.; Robertson, Charles E.; Hamm, Christina M.; Kpadeh, Zegbeh; Zhang, Tianyi; Chen, Hongyan et al. (2011): Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases. In: *Inflammatory Bowel Diseases* 17 (1), S. 179–184.

Frank, Daniel N.; St Amand, Allison L.; Feldman, Robert A.; Boedeker, Edgar C.; Harpaz, Noam; Pace, Norman R. (2007): Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (34), S. 13780–13785.

Furuse, Mikio; Sasaki, Hiroyuki; Tsukita, Shoichiro (1999): Manner of Interaction of Heterogeneous Claudin Species within and between Tight Junction Strands. In: *The Journal of cell biology* 147 (4), S. 891–903.

Fuss, I. J.; Neurath, M.; Boirivant, M.; Klein, J. S.; La Motte, C. de; Strong, S. A. et al. (1996): Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. In: *The Journal of Immunology* 157 (3), S. 1261–1270.

Fuss, Ivan J. (2008): Is the Th1/Th2 paradigm of immune regulation applicable to IBD? In: *Inflammatory Bowel Diseases* 14 Suppl 2, S110-2.

Gajewski, T. F.; Fitch, F. W. **(1988)**: Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. In: *The Journal of Immunology* 140 (12), S. 4245–4252.

Gallo, Richard L.; Hooper, Lora V. **(2012)**: Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. In: *Nature reviews. Immunology* 12 (7), S. 503–516.

Gambineri, Eleonora; Torgerson, Troy R.; Ochs, Hans D. **(2003)**: Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. In: *Current Opinion in Rheumatology* 15 (4), S. 430–435.

Garcia-Hernandez, Vicky; Quiros, Miguel; Nusrat, Asma **(2017)**: Intestinal epithelial claudins. Expression and regulation in homeostasis and inflammation. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*.

Garrett, Wendy S.; Lord, Graham M.; Punit, Shivesh; Lugo-Villarino, Geanncarlo; Mazmanian, Sarkis K.; Ito, Susumu et al. **(2007)**: Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system. In: *Cell* 131 (1), S. 33–45.

Gautreaux, M. D.; Gelder, F. B.; Deitch, E. A.; Berg, R. D. **(1995)**: Adoptive transfer of T lymphocytes to T-cell-depleted mice inhibits Escherichia coli translocation from the gastrointestinal tract. In: *Infection and immunity* 63 (10), S. 3827–3834.

Geller, David A.; Billiar, Timothy R. **(1998)**: Molecular biology of nitric oxide synthases. In: *Cancer metastasis reviews* 17 (1), S. 7–23.

Gerberick, G. F.; Cruse, L. W.; Miller, C. M.; Sikorski, E. E.; Ridder, G. M. **(1997)**: Selective modulation of T cell memory markers CD62L and CD44 on murine draining lymph node cells following allergen and irritant treatment. In: *Toxicology and applied pharmacology* 146 (1), S. 1–10.

Gersemann, M.; Wehkamp, J.; Stange, E. F. **(2012)**: Innate immune dysfunction in inflammatory bowel disease. In: *J Intern Med* 271 (5), S. 421–428.

Geuking, Markus B.; Cahenzli, Julia; Lawson, Melissa A. E.; Ng, Derek C. K.; Slack, Emma; Hapfelmeier, Siegfried et al. **(2011)**: Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. In: *Immunity* 34 (5), S. 794–806.

Gold, P.; Freedman, S.O. **(1965)**: Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. In: *J Exp Med* 122 (3), S. 467–481

Goldstein, Mitchell; Mitchell, Edith Peterson (2005): Carcinoembryonic Antigen in the Staging and Follow-up of Patients with Colorectal Cancer. In: *LCNV* 23 (4), S. 338–351.

Gray-Owen, Scott D.; Blumberg, Richard S. (2006): CEACAM1: contact-dependent control of immunity. In: *Nature reviews. Immunology* 6 (6), S. 433–446.

Greicius, Gediminas; Severinson, Eva; Beauchemin, Nicole; Obrink, Bjorn; Singer, Bernhard B. (2003): CEACAM1 is a potent regulator of B cell receptor complex-induced activation. In: *Journal of leukocyte biology* 74 (1), S. 126–134.

Groschwitz, Katherine R.; Hogan, Simon P. (2009): Intestinal barrier function. Molecular regulation and disease pathogenesis. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 124 (1), S. 3–20.

Guan, Qingdong; Zhang, Jiguo (2017): Recent Advances. The Imbalance of Cytokines in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. In: *Mediators of inflammation* 2017, S. 4810258.

Gupta, Jalaj; Nebreda, Angel (2014): Analysis of Intestinal Permeability in Mice. In: *BIO-PROTOCOL* 4 (22).

Guttman, Julian A.; Li, Yuling; Wickham, Mark E.; Deng, Wanyin; Vogl, A. Wayne; Finlay, B. Brett (2006a): Attaching and effacing pathogen-induced tight junction disruption in vivo. In: *Cellular microbiology* 8 (4), S. 634–645.

Guttman, Julian A.; Samji, Fereshte N.; Li, Yuling; Vogl, A. Wayne; Finlay, B. Brett (2006b): Evidence that tight junctions are disrupted due to intimate bacterial contact and not inflammation during attaching and effacing pathogen infection in vivo. In: *Infection and immunity* 74 (11), S. 6075–6084.

Halbleib, Jennifer M.; Nelson, W. James (2006): Cadherins in development. Cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. In: *Genes & development* 20 (23), S. 3199–3214.

Halme, Leena (2006): Family and twin studies in inflammatory bowel disease. In: *World journal of gastroenterology* 12 (23), S. 3668.

Hammarstrom, S. (1999): The carcinoembryonic antigen (CEA) family. Structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. In: *Seminars in cancer biology* 9 (2), S. 67–81.

Hammarstrom, S.; Baranov, V. **(2001)**: Is there a role for CEA in innate immunity in the colon? In: *Trends in microbiology* 9 (3), S. 119–125.

Han, Siew Ping; Yap, Alpha S. **(2012)**: The cytoskeleton and classical cadherin adhesions. In: *Sub-cellular biochemistry* 60, S. 111–135.

Han, Eric; Phan, Dillon; Lo, Piao; Poy, Matthew N.; Behringer, Richard; Najjar, Sonia M.; Lin, Sue-Hwa **(2001)**: Differences in tissue-specific and embryonic expression of mouse Ceacam1 and Ceacam2 genes. In: *The Biochemical journal* 355 (2), S. 417–423.

Harries, A. D.; Baird, A.; Rhodes, J. **(1982)**: Non-smoking. A feature of ulcerative colitis. In: *British medical journal (Clinical research ed.)* 284 (6317), S. 706.

Harris, M. L.; Schiller, H. J.; Reilly, P. M.; Donowitz, M.; Grisham, M. B.; Bulkley, G. B. **(1992)**: Free radicals and other reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease. Cause, consequence or epiphenomenon? In: *Pharmacology & therapeutics* 53 (3), S. 375–408.

Harty, J. T.; Tvinnereim, A. R.; White, D. W. **(2000)**: CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. In: *Annual review of immunology* 18, S. 275–308. DOI: 10.1146/annurev.immunol.18.1.275.

Heffernan, E. J.; Fierer, J.; Chikami, G.; Guiney, D. **(1987)**: Natural History of Oral Salmonella dublin Infection in BALB/c Mice. Effect of an 80-Kilobase-Pair Plasmid on Virulence. In: *The Journal of infectious diseases* 155 (6), S. 1254–1259.

Heller, Frank; Florian, Peter; Bojarski, Christian; Richter, Jan; Christ, Melanie; Hillenbrand, Bernd et al. **(2005)**: Interleukin-13 Is the Key Effector Th2 Cytokine in Ulcerative Colitis That Affects Epithelial Tight Junctions, Apoptosis, and Cell Restitution. In: *Gastroenterology* 129 (2), S. 550–564.

Hemon, Patrice; Jean-Louis, Francette; Ramgolam, Kiran; Brignone, Chrystelle; Viguiier, Manuelle; Bachelez, Hervé et al. **(2011)**: MHC class II engagement by its ligand LAG-3 (CD223) contributes to melanoma resistance to apoptosis. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 186 (9), S. 5173–5183.

Henderson, Paul; van Limbergen, Johan E.; Schwarze, Jürgen; Wilson, David C. **(2011)**: Function of the intestinal epithelium and its dysregulation in inflammatory bowel disease. In: *Inflammatory Bowel Diseases* 17 (1), S. 382–395.

- Hermiston, M. L.; Gordon, J. I. **(1995a)**: In vivo analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium. Essential roles in adhesion, maintenance of differentiation, and regulation of programmed cell death. In: *The Journal of cell biology* 129 (2), S. 489–506.
- Hermiston, M. L.; Gordon, J. I. **(1995b)**: Inflammatory Bowel Disease and Adenomas in Mice Expressing a Dominant Negative N-Cadherin. In: *Science (New York, N.Y.)* 270 (5239), S. 1203–1207.
- Hollander, D.; Vadheim, C. M.; Brettholz, E.; Petersen, G. M.; Delahunty, T.; Rotter, J. I. **(1986)**: Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. In: *Annals of internal medicine* 105 (6), S. 883–885.
- Holländer, Georg A.; Simpson, Stephen J.; Mizoguchi, Emiko; Nichogiannopoulou, Aiki; She, Jian; Gutierrez-Ramos, José-Carlos et al. **(1995)**: Severe colitis in mice with aberrant thymic selection. In: *Immunity* 3 (1), S. 27–38.
- Hooper, Lora V. **(2009)**: Do symbiotic bacteria subvert host immunity? In: *Nature reviews. Microbiology* 7 (5), S. 367–374.
- Hooper, Lora V.; Macpherson, Andrew J. **(2010)**: Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. In: *Nature reviews. Immunology* 10 (3), S. 159–169.
- Horst, A. K.; Wagener, C. **(2004)**: CEA-Related CAMs. In: *Handbook of experimental pharmacology* (165), S. 283–341.
- Huang, Ching-Tai; Workman, Creg J.; Flies, Dallas; Pan, Xiaoyu; Marson, Aimee L.; Zhou, Gang et al. **(2004)**: Role of LAG-3 in regulatory T cells. In: *Immunity* 21 (4), S. 503–513.
- Huang, Hu; Shen, Jikui; Viores, Stanley A. **(2011)**: Blockade of VEGFR1 and 2 suppresses pathological angiogenesis and vascular leakage in the eye. In: *PloS one* 6 (6), e21411.
- Huang, Yu-Hwa; Zhu, Chen; Kondo, Yasuyuki; Anderson, Ana C.; Gandhi, Amit; Russell, Andrew et al. **(2015)**: CEACAM1 regulates TIM-3-mediated tolerance and exhaustion. In: *Nature* 517 (7534), S. 386–390.

Hugot, J. P.; Chamaillard, M.; Zouali, H.; Lesage, S.; Cézard, J. P.; Belaiche, J. et al. (2001): Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. In: *Nature* 411 (6837), S. 599–603.

Hwang, Soonyean; Zimmerman, Noah P.; Agle, Kimberle A.; Turner, Jerrold R.; Kumar, Suresh N.; Dwinell, Michael B. (2012): E-cadherin is critical for collective sheet migration and is regulated by the chemokine CXCL12 protein during restitution. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (26), S. 22227–22240.

Ieda, Junji; Yokoyama, Shozo; Tamura, Koichi; Takifuji, Katsunari; Hotta, Tsukasa; Matsuda, Kenji et al. (2011): Re-expression of CEACAM1 long cytoplasmic domain isoform is associated with invasion and migration of colorectal cancer. In: *Int. J. Cancer* 129 (6), S. 1351–1361.

Iijima, Hideki; Neurath, Markus F.; Nagaishi, Takashi; Glickman, Jonathan N.; Nieuwenhuis, Edward E.; Nakajima, Atsushi et al. (2004): Specific regulation of T helper cell 1-mediated murine colitis by CEACAM1. In: *J Exp Med* 199 (4), S. 471–482.

Isaacs, Kim L.; Lewis, James D.; Sandborn, William J.; Sands, Bruce E.; Targan, Stephan R. (2005): State of the Art. Ibd Therapy and Clinical Trials in Ibd. In: *Inflammatory Bowel Diseases* 11, S3-S12.

Ishikawa, Chisato; Tanabe, Hiroki; Maemoto, Atsuo; Ito, Takahiro; Watari, Jiro; Kono, Toru et al. (2010): Precursor processing of human defensin-5 is essential to the multiple functions in vitro and in vivo. In: *Journal of innate immunity* 2 (1), S. 66–76.

Ivanov, Ivaylo I.; Atarashi, Koji; Manel, Nicolas; Brodie, Eoin L.; Shima, Tatsuichiro; Karaoz, Ulas et al. (2009): Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. In: *Cell* 139 (3), S. 485–498.

Izumi, Genkichi; Sakisaka, Toshiaki; Baba, Takeshi; Tanaka, Shintaro; Morimoto, Koji; Takai, Yoshimi (2004): Endocytosis of E-cadherin regulated by Rac and Cdc42 small G proteins through IQGAP1 and actin filaments. In: *The Journal of cell biology* 166 (2), S. 237–248.

Jiang, Wenyu; Su, Jiewen; Zhang, Xiaofei; Cheng, Xiuqin; Zhou, Jun; Shi, Ruihua; Zhang, Hongjie (2014): Elevated levels of Th17 cells and Th17-related cytokines are associated with disease activity in patients with inflammatory bowel disease. In:

Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society 63 (11), S. 943–950.

Jin, Yu; Lin, Yan; Lin, Lianjie; Sun, Yan; Zheng, Changqing (2016): Carcinoembryonic antigen related cellular adhesion molecule 1 alleviates dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice. In: *Life sciences* 149, S. 120–128.

Johansson, Malin E. V.; Larsson, Jessica M. Holmen; Hansson, Gunnar C. (2011): The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 Suppl 1, S. 4659–4665.

Johansson, Malin E. V.; Phillipson, Mia; Petersson, Joel; Velcich, Anna; Holm, Lena; Hansson, Gunnar C. (2008): The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (39), S. 15064–15069.

John A. Thompson; Fritz Grunert; Wolfgang Zimmermann: Carcinoembryonic Antigen Gene Family.

Jostins, Luke; Ripke, Stephan; Weersma, Rinse K.; Duerr, Richard H.; McGovern, Dermot P.; Hui, Ken Y. et al. (2012): Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. In: *Nature* 491 (7422), S. 119–124.

Jung, Camille; Hugot, Jean-Pierre; Barreau, Frédérick (2010): Peyer's Patches. The Immune Sensors of the Intestine. In: *International journal of inflammation* 2010, S. 823710.

Kammerer, Robert; Hahn, Stefan; Singer, Bernhard B.; S, Jian; Luo; Kleist, Sabine von (1998): Biliary glycoprotein (CD66a), a cell adhesion molecule of the immunoglobulin superfamily, on human lymphocytes. Structure, expression and involvement in T cell activation. In: *European journal of immunology* 28 (11), S. 3664–3674.

Kammerer, Robert; Zimmermann, Wolfgang (2010): Coevolution of activating and inhibitory receptors within mammalian carcinoembryonic antigen families. In: *BMC biology* 8, S. 12.

Kamradt, T.; Hansen, G.; Bechmann, I.; Burmester, G. R. (2003): T-Zelltoleranz und Autoimmunität. In: *Der Internist* 44 (2), S. 146–152.

Karayiannakis, Anastasios J.; Syrigos, Konstantinos N.; Efstathiou, Jason; Valizadeh, Ali; Noda, Masao; Playford, Raymond J. et al. **(1998)**: Expression of catenins and E-cadherin during epithelial restitution in inflammatory bowel disease. In: *J. Pathol.* 185 (4), S. 413–418.

Karlinger, Kinga; Györke, Tamás; Makö, Ernő; Mester, Ádám; Tarján, Zsolt **(2000)**: The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. In: *European Journal of Radiology* 35 (3), S. 154–167.

Keir, Mary E.; Butte, Manish J.; Freeman, Gordon J.; Sharpe, Arlene H. **(2008)**: PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. In: *Annual review of immunology* 26, S. 677–704.

Khan, W. N.; Hammarström, S.; Ramos, T. **(1993)**: Expression of antigens of the carcinoembryonic antigen family on B cell lymphomas and Epstein-Barr virus immortalized B cell lines. In: *Int Immunol* 5 (3), S. 265–270.

Khor, Bernard; Gardet, Agnes; Xavier, Ramnik J. **(2011)**: Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. In: *Nature* 474 (7351), S. 307–317.

Klaile, Esther; Klassert, Tilman E.; Scheffrahn, Inka; Muller, Mario M.; Heinrich, Annina; Heyl, Kerstin A. et al. **(2013)**: Carcinoembryonic antigen (CEA)-related cell adhesion molecules are co-expressed in the human lung and their expression can be modulated in bronchial epithelial cells by non-typable *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, TLR3, and type I and II interferons. In: *Respiratory research* 14, S. 85.

Kobayashi, T.; Okamoto, S.; Hisamatsu, T.; Kamada, N.; Chinen, H.; Saito, R. et al. **(2008)**: IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. In: *Gut* 57 (12), S. 1682–1689.

Kolls, Jay K.; Lindén, Anders **(2004)**: Interleukin-17 family members and inflammation. In: *Immunity* 21 (4), S. 467–476.

König, R.; Huang, L. Y.; Germain, R. N. **(1992)**: MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8. In: *Nature* 356 (6372), S. 796–798.

Kontoyiannis, Dimitris; Pasparakis, Manolis; Pizarro, Theresa T.; Cominelli, Fabio; Kollias, George **(1999)**: Impaired On/Off Regulation of TNF Biosynthesis in Mice Lacking TNF AU-Rich Elements. In: *Immunity* 10 (3), S. 387–398.

- Koroleva, Ekaterina P.; Halperin, Sydney; Gubernatorova, Ekaterina O.; Macho-Fernandez, Elise; Spencer, Cody M.; Tumanov, Alexei V. (2015): *Citrobacter rodentium*-induced colitis: A robust model to study mucosal immune responses in the gut. In: *Journal of Immunological Methods* 421, S. 61–72.
- Kosiewicz, M. M.; Nast, C. C.; Krishnan, A.; Rivera-Nieves, J.; Moskaluk, C. A.; Matsumoto, S. et al. (2001): Th1-type responses mediate spontaneous ileitis in a novel murine model of Crohn's disease. In: *The Journal of clinical investigation* 107 (6), S. 695–702.
- Kraehenbuhl, J. P.; Neutra, M. R. (2000): Epithelial M cells. Differentiation and function. In: *Annual review of cell and developmental biology* 16, S. 301–332.
- Kuespert, Katharina; Pils, Stefan; Hauck, Christof R. (2006): CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology. In: *Current Opinion in Cell Biology* 18 (5), S. 565–571.
- Kunzelmann, Karl; Mall, Marcus (2002): Electrolyte transport in the mammalian colon. Mechanisms and implications for disease. In: *Physiological reviews* 82 (1), S. 245–289.
- Lai, Yuping; Gallo, Richard L. (2009): AMPed up immunity. How antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. In: *Trends in immunology* 30 (3), S. 131–141.
- Lai, Yushuan; Rosenshine, Ilan; Leong, John M.; Frankel, Gad (2013): Intimate host attachment. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. In: *Cellular microbiology* 15 (11), S. 1796–1808.
- Lakatos, Peter-Laszlo (2008): Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis. Changes, causes and management strategies. In: *WJG* 14 (25), S. 3937.
- Lars Frängsmyr; Vladimir Baranov; Friedrich Prall; Wagener, C.; Hammarstrom, S. (1995): Cell- and Region-specific Expression of Biliary Glycoprotein and Its Messenger RNA in Normal Human Colonic Mucosa. In: *Cancer research* (55), S. 2963–2967.
- Larsson, Erik; Tremaroli, Valentina; Lee, Ying Shiuan; Koren, Omry; Nookaew, Intawat; Fricker, Ashwana et al. (2012): Analysis of gut microbial regulation of host gene expression along the length of the gut and regulation of gut microbial ecology through MyD88. In: *Gut* 61 (8), S. 1124–1131.
- Le, Tam Luan; Yap, Alpha S.; Stow, Jennifer L. (1999): Recycling of E-Cadherin. In: *The Journal of cell biology* 146 (1), S. 219–232.

- Lee, Yun Kyung; Turner, Henrietta; Maynard, Craig L.; Oliver, James R.; Chen, Dongquan; Elson, Charles O.; Weaver, Casey T. (2009): Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. In: *Immunity* 30 (1), S. 92–107.
- Lesage, Suzanne; Zouali, Habib; Cézard, Jean-Pierre; Colombel, Jean-Frédéric; Belaiche, Jacques; Almer, Sven et al. (2002): CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. In: *American journal of human genetics* 70 (4), S. 845–857.
- Leung, N.; Turbide, C.; Balachandra, B.; Marcus, V.; Beauchemin, N. (2008): Intestinal tumor progression is promoted by decreased apoptosis and dysregulated Wnt signaling in Ceacam1^{-/-} mice. In: *Oncogene* 27 (36), S. 4943–4953.
- Leung, N.; Turbide, C.; Olson, M.; Marcus, V.; Jothy, S.; Beauchemin, N. (2006): Deletion of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (Ceacam1) gene contributes to colon tumor progression in a murine model of carcinogenesis. In: *Oncogene* 25 (40), S. 5527–5536.
- Leusch, H. G.; Drzeniek, Z.; Markos-Pusztai, Z.; Wagener, C. (1991): Binding of Escherichia coli and Salmonella strains to members of the carcinoembryonic antigen family. Differential binding inhibition by aromatic alpha-glycosides of mannose. In: *Infection and immunity* 59 (6), S. 2051–2057.
- Li, Ming O.; Sanjabi, Shomyseh; Flavell, Richard A. (2006): Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. In: *Immunity* 25 (3), S. 455–471.
- Li, Qiurong; Zhang, Qiang; Wang, Chenyang; Li, Ning; Li, Jieshou (2008): Invasion of enteropathogenic Escherichia coli into host cells through epithelial tight junctions. In: *The FEBS journal* 275 (23), S. 6022–6032.
- Lis M. Higgins, Gad Frankel, Gill Douce, Gordon Dougan and Thomas T. MacDonald (1999): *Citrobacter rodentium* Infection in Mice Elicits a Mucosal Th1 Cytokine Response and Lesions Similar to Those in Murine Inflammatory Bowel Disease. In: *Infection and immunity* (Vol. 67, No. 6), S. 3031–3039.
- Liu, Hou-Pu; Cao, Anthony T.; Feng, Ting; Li, Qingjie; Zhang, Wenbo; Yao, Suxia et al. (2015): TGF- β converts Th1 cells into Th17 cells through stimulation of Runx1 expression. In: *European journal of immunology* 45 (4), S. 1010–1018.

Liu, Z.; Lefrancois, L. (2004): Intestinal Epithelial Antigen Induces Mucosal CD8 T Cell Tolerance, Activation, and Inflammatory Response. In: *The Journal of Immunology* 173 (7), S. 4324–4330.

Luperchio, Steven A.; Schauer, David B. (2001): Molecular pathogenesis of *Citrobacter rodentium* and transmissible murine colonic hyperplasia. In: *Microbes and Infection* 3 (4), S. 333–340.

Luperchio, Steven A, Joseph V. Newman, Charles A. Dangler, Mark D. Schrenzel, Don J. Brenner, Arnold G. Steigerwalt and, David B. Schauer (2000): *Citrobacter rodentium*, the Causative Agent of Transmissible Murine Colonic Hyperplasia, Exhibits Clonality: Synonymy of *C. rodentium* and Mouse-Pathogenic *E. coli*. In: *Journal of Clinical Microbiology*, S. 434—4350.

Maaser, Christian; Housley, Michael P.; Iimura, Mitsutoshi; Smith, Jennifer R.; Vallance, Bruce A.; Finlay, B. Brett et al. (2004): Clearance of *Citrobacter rodentium* requires B cells but not secretory immunoglobulin A (IgA) or IgM antibodies. In: *Infection and immunity* 72 (6), S. 3315–3324.

Macpherson, Andrew J.; Geuking, Markus B.; McCoy, Kathy D. (2005): Immune responses that adapt the intestinal mucosa to commensal intestinal bacteria. In: *Immunology* 115 (2), S. 153–162.

Macpherson, Andrew J.; Slack, Emma; Geuking, Markus B.; McCoy, Kathy D. (2009): The mucosal firewalls against commensal intestinal microbes. In: *Seminars in immunopathology* 31 (2), S. 145–149.

Macpherson, Andrew J.; Uhr, Therese (2004): Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. In: *Science (New York, N.Y.)* 303 (5664), S. 1662–1665.

Madara, J. L.; Stafford, J. (1989): Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. In: *The Journal of clinical investigation* 83 (2), S. 724–727.

Mahid, Suhal S.; Minor, Kyle S.; Soto, Roberto E.; Hornung, Carlton A.; Galandiuk, Susan (2006): Smoking and inflammatory bowel disease. A meta-analysis. In: *Mayo Clinic proceedings* 81 (11), S. 1462–1471.

- Mahida, Yashwant R.; Rolfe, Vivien E. **(2004)**: Host-bacterial interactions in inflammatory bowel disease. In: *Clinical science (London, England : 1979)* 107 (4), S. 331–341.
- Mähler, M.; Bristol, I. J.; Leiter, E. H.; Workman, A. E.; Birkenmeier, E. H.; Elson, C. O.; Sundberg, J. P. **(1998)**: Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis. In: *The American journal of physiology* 274 (3 Pt 1), G544-51.
- Mankertz, Joachim; Schulzke, Jorg-Dieter **(2007)**: Altered permeability in inflammatory bowel disease. Pathophysiology and clinical implications. In: *Current opinion in gastroenterology* 23 (4), S. 379–383.
- Mastroianni, Jennifer R.; Ouellette, André J. **(2009)**: Alpha-defensins in enteric innate immunity. Functional Paneth cell alpha-defensins in mouse colonic lumen. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (41), S. 27848–27856.
- Mathews, J. E.; Peterson, R. F.; Eberts, J. P.; White, R. R. **(1971)**: Transmural disease of the alimentary tract. In: *Annals of surgery* 173 (6), S. 966–970.
- Matsuda, Miho; Kubo, Akiharu; Furuse, Mikio; Tsukita, Shoichiro **(2004)**: A peculiar internalization of claudins, tight junction-specific adhesion molecules, during the intercellular movement of epithelial cells. In: *Journal of cell science* 117 (Pt 7), S. 1247–1257.
- Maynard, Craig L.; Elson, Charles O.; Hatton, Robin D.; Weaver, Casey T. **(2012)**: Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. In: *Nature* 489 (7415), S. 231–241.
- Mazmanian, Sarkis K.; Liu, Cui Hua; Tzianabos, Arthur O.; Kasper, Dennis L. **(2005)**: An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. In: *Cell* 122 (1), S. 107–118.
- McDaniel, T. K.; Jarvis, K. G.; Donnenberg, M. S.; Kaper, J. B. **(1995)**: A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (5), S. 1664–1668.
- Mehta, Shameer; Nijhuis, Anke; Kumagai, Tomoko; Lindsay, James; Silver, Andrew **(2015)**: Defects in the adherens junction complex (E-cadherin/ β -catenin) in inflammatory bowel disease. In: *Cell and tissue research* 360 (3), S. 749–760.

Milatz, Susanne; Krug, Susanne M.; Rosenthal, Rita; Günzel, Dorothee; Müller, Dominik; Schulzke, Jörg-Dieter et al. **(2010)**: Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes. In: *Biochimica et biophysica acta* 1798 (11), S. 2048–2057.

Mills, Kingston H. G. **(2004)**: Regulatory T cells. Friend or foe in immunity to infection? In: *Nature reviews. Immunology* 4 (11), S. 841–855.

Mineta, Katsuhiko; Yamamoto, Yasuko; Yamazaki, Yuji; Tanaka, Hiroo; Tada, Yukiyo; Saito, Kuniaki et al. **(2011)**: Predicted expansion of the claudin multigene family. In: *FEBS letters* 585 (4), S. 606–612.

Miossec, Pierre **(2007)**: Interleukin-17 in fashion, at last. Ten years after its description, its cellular source has been identified. In: *Arthritis and rheumatism* 56 (7), S. 2111–2115.

Mizoguchi, A.; Mizoguchi, E.; Chiba, C.; Spiekermann, G. M.; Tonegawa, S.; Nagler-Anderson, C.; Bhan, A. K. **(1996)**: Cytokine imbalance and autoantibody production in T cell receptor-alpha mutant mice with inflammatory bowel disease. In: *J Exp Med* 183 (3), S. 847–856.

Mizoguchi, Atsushi **(2012)**: Animal models of inflammatory bowel disease. In: *Progress in molecular biology and translational science* 105, S. 263–320.

Möller, Marcus J.; Kammerer, Robert; Grunert, Fritz; Kleist, Sabine von **(1996)**: Biliary glycoprotein (BGP) expression on T cells and on a natural-killer-cell sub-population. In: *Int. J. Cancer* 65 (6), S. 740–745.

Molodecky, Natalie A.; Soon, Ing Shian; Rabi, Doreen M.; Ghali, William A.; Ferris, Mollie; Chernoff, Greg et al. **(2012)**: Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. In: *Gastroenterology* 142 (1), 46-54.e42; quiz e30.

Monney, Laurent; Sabatos, Catherine A.; Gaglia, Jason L.; Ryu, Akemi; Waldner, Hanspeter; Chernova, Tatyana et al. **(2002)**: Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. In: *Nature* 415 (6871), S. 536–541.

Morales, V. M.; Christ, A.; Watt, S. M.; Kim, H. S.; Johnson, K. W.; Utku, N. et al. **(1999)**: Regulation of human intestinal intraepithelial lymphocyte cytolytic function by biliary glycoprotein (CD66a). In: *The Journal of Immunology* 163 (3), S. 1363–1370.

- Mowat, Allan Mcl (**2003**): Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. In: *Nature reviews. Immunology* 3 (4), S. 331–341.
- Muenzner, P.; Dehio, C.; Fujiwara, T.; Achtman, M.; Meyer, T. F.; Gray-Owen, S. D. (**2000**): Carcinoembryonic antigen family receptor specificity of *Neisseria meningitidis* Opa variants influences adherence to and invasion of proinflammatory cytokine-activated endothelial cells. In: *Infection and immunity* 68 (6), S. 3601–3607.
- Muenzner, Petra; Bachmann, Verena; Kuespert, Katharina; Hauck, Christof R. (**2008**): The CEACAM1 transmembrane domain, but not the cytoplasmic domain, directs internalization of human pathogens via membrane microdomains. In: *Cellular microbiology* 10 (5), S. 1074–1092.
- Mundy, Rosanna; MacDonald, Thomas T.; Dougan, Gordon; Frankel, Gad; Wiles, Siouxsie (**2005**): *Citrobacter rodentium* of mice and man. In: *Cellular microbiology* 7 (12), S. 1697–1706.
- Muniz, Luciana R.; Knosp, Camille; Yeretssian, Garabet (**2012**): Intestinal antimicrobial peptides during homeostasis, infection, and disease. In: *Frontiers in immunology* 3, S. 310.
- Muza-Moons, Michelle M.; Schneeberger, Eveline E.; Hecht, Gail A. (**2004**): Enteropathogenic *Escherichia coli* infection leads to appearance of aberrant tight junction strands in the lateral membrane of intestinal epithelial cells. In: *Cellular microbiology* 6 (8), S. 783–793.
- Nagaishi, Takashi; Pao, Lily; Lin, Sue-Hwa; Iijima, Hideki; Kaser, Arthur; Qiao, Shuo-Wang et al. (**2006**): SHP1 phosphatase-dependent T cell inhibition by CEACAM1 adhesion molecule isoforms. In: *Immunity* 25 (5), S. 769–781.
- Nakajima, A.; Iijima, H.; Neurath, M. F.; Nagaishi, T.; Nieuwenhuis, E. E. S.; Raychowdhury, R. et al. (**2002**): Activation-Induced Expression of Carcinoembryonic Antigen-Cell Adhesion Molecule 1 Regulates Mouse T Lymphocyte Function. In: *The Journal of Immunology* 168 (3), S. 1028–1035.
- Naydenov, Nayden G.; Brown, Bryan; Harris, Gianni; Dohn, Michael R.; Morales, Victor M.; Baranwal, Somesh et al. (**2012**): A Membrane Fusion Protein ? SNAP Is a Novel Regulator of Epithelial Apical Junctions. In: *PloS one* 7 (4), e34320.
- Neurath, M. F.; Finotto, S. (**2006**): The many roads to inflammatory bowel diseases. In: *Immunity* 25 (2), S. 189–191. DOI: 10.1016/j.immuni.2006.08.005.

Neurath, M. F.; Fuss, I.; Kelsall, B. L.; Stüber, E.; Strober, W. (1995): Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. In: *J Exp Med* 182 (5), S. 1281–1290.

Neurath, Markus F. (2014): Cytokines in inflammatory bowel disease. In: *Nature reviews. Immunology* 14 (5), S. 329–342.

Niess, Jan Hendrik; Brand, Stephan; Gu, Xiubin; Landsman, Limor; Jung, Steffen; McCormick, Beth A. et al. (2005): CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. In: *Science (New York, N.Y.)* 307 (5707), S. 254–258.

Nishida, Atsushi; Lau, Cindy W.; Zhang, Mei; Andoh, Akira; Shi, Hai Ning; Mizoguchi, Emiko; Mizoguchi, Atsushi (2012): The membrane-bound mucin Muc1 regulates T helper 17-cell responses and colitis in mice. In: *Gastroenterology* 142 (4), 865-874.e2.

Nittka, Stefanie; Gunther, Juliane; Ebisch, Cornelia; Erbersdobler, Andreas; Neumaier, Michael (2004): The human tumor suppressor CEACAM1 modulates apoptosis and is implicated in early colorectal tumorigenesis. In: *Oncogene* 23 (58), S. 9306–9313.

Öbrink, Björn (1997): CEA adhesion molecules. Multifunctional proteins with signal-regulatory properties. In: *Current Opinion in Cell Biology* 9 (5), S. 616–626.

Odorizzi, Pamela M.; Wherry, E. John (2012): Inhibitory receptors on lymphocytes. Insights from infections. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 188 (7), S. 2957–2965.

Ogura, Y.; Bonen, D. K.; Inohara, N.; Nicolae, D. L.; Chen, F. F.; Ramos, R. et al. (2001): A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. In: *Nature* 411 (6837), S. 603–606.

Oikawa, S.; Kuroki, M.; Matsuoka, Y.; Kosaki, G.; Nakazato, H. (1992): Homotypic and heterotypic Ca(++)-independent cell adhesion activities of biliary glycoprotein, a member of carcinoembryonic antigen family, expressed on CHO cell surface. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 186 (2), S. 881–887.

Okayasu, I.; Hatakeyama, S.; Yamada, M.; Ohkusa, T.; Inagaki, Y.; Nakaya, R. (1990): A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. In: *Gastroenterology* 98 (3), S. 694–702.

Oliver, J. M.; Berlin, R. D.; Davis, B. H. (1984): Use of horseradish peroxidase and fluorescent dextrans to study fluid pinocytosis in leukocytes. In: *Methods in enzymology* 108, S. 336–347.

Olsen, Trine; Rismo, Renathe; Cui, Guanglin; Goll, Rasmus; Christiansen, Ingrid; Florholmen, Jon (2011): TH1 and TH17 interactions in untreated inflamed mucosa of inflammatory bowel disease, and their potential to mediate the inflammation. In: *Cytokine* 56 (3), S. 633–640.

Ou, G.; Baranov, V.; Lundmark, E.; Hammarström, S.; Hammarström, M-L (2009): Contribution of intestinal epithelial cells to innate immunity of the human gut--studies on polarized monolayers of colon carcinoma cells. In: *Scandinavian journal of immunology* 69 (2), S. 150–161.

Peterson, Lance W.; Artis, David (2014): Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. In: *Nature reviews. Immunology* 14 (3), S. 141–153.

Petty, Nicola K.; Bulgin, Richard; Crepin, Valerie F.; Cerdeno-Tarraga, Ana M.; Schroeder, Gunnar N.; Quail, Michael A. et al. (2010): The *Citrobacter rodentium* genome sequence reveals convergent evolution with human pathogenic *Escherichia coli*. In: *Journal of bacteriology* 192 (2), S. 525–538.

Pineton de Chambrun, Guillaume; Colombel, Jean-Frédéric; Poulain, Daniel; Darfeuille-Michaud, Arlette (2008): Pathogenic agents in inflammatory bowel diseases. In: *Current opinion in gastroenterology* 24 (4), S. 440–447.

Podolsky, D. K. (1999): Mucosal immunity and inflammation. V. Innate mechanisms of mucosal defense and repair. The best offense is a good defense. In: *The American journal of physiology* 277 (3 Pt 1), G495-9.

Podolsky, Daniel K. (2002): The current future understanding of inflammatory bowel disease. In: *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 16 (6), S. 933–943.

Poritz, Lisa S.; Garver, Kristian I.; Green, Cecelia; Fitzpatrick, Leo; Ruggiero, Francesca; Koltun, Walter A. (2007): Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. In: *The Journal of surgical research* 140 (1), S. 12–19.

Powrie, Flona; Leach, Michael W.; Mauze, Smita; Caddie, Linda Barcomb; Coffman, Robert L. (1993): Phenotypically distinct subsets of CD4 + T cells induce or protect

from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. In: *Int Immunol* 5 (11), S. 1461–1471.

Prasad, Shyam; Mingrino, Roberto; Kaukinen, Katri; Hayes, Katherine L.; Powell, Robert M.; MacDonald, Thomas T.; Collins, Jane E. (2005): Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 85 (9), S. 1139–1162.

Pull, Sarah L.; Doherty, Jason M.; Mills, Jason C.; Gordon, Jeffrey I.; Stappenbeck, Thaddeus S. (2005): Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (1), S. 99–104. DOI: 10.1073/pnas.0405979102.

Radulovic, Katarina; Niess, Jan Hendrik (2015): CD69 is the crucial regulator of intestinal inflammation: a new target molecule for IBD treatment? In: *Journal of immunology research* 2015, S. 497056.

Rafael Fernandez-botran (1988): Lymphokine-mediated regulation of the proliferative response of clones of TH1 and TH2 cells. In: *J Exp Med* (168), S. 543–558.

Rahner, Christoph; Mitic, Laura L.; Anderson, James M. (2001): Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. In: *Gastroenterology* 120 (2), S. 411–422.

Robert, Caroline; Schachter, Jacob; Long, Georgina V.; Arance, Ana; Grob, Jean Jacques; Mortier, Laurent et al. (2015): Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. In: *N Engl J Med* 372 (26), S. 2521–2532.

Roda, Giulia; Sartini, Alessandro; Zambon, Elisabetta; Calafiore, Andrea; Marocchi, Margherita; Caponi, Alessandra et al. (2010): Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases. In: *World journal of gastroenterology* 16 (34), S. 4264–4271.

Rojas, Raul; Apodaca, Gerard (2002): Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 3 (12), S. 944–955.

Romagnani, S. (1999): Th1/Th2 cells. In: *Inflammatory Bowel Diseases* 5 (4), S. 285–294.

Rovedatti, L.; Kudo, T.; Biancheri, P.; Sarra, M.; Knowles, C. H.; Rampton, D. S. et al. (2009): Differential regulation of interleukin 17 and interferon gamma production in inflammatory bowel disease. In: *Gut* 58 (12), S. 1629–1636.

- Rudolph, U.; Finegold, M. J.; Rich, S. S.; Harriman, G. R.; Srinivasan, Y.; Brabet, P. et al. (1995): Ulcerative colitis and adenocarcinoma of the colon in G alpha i2-deficient mice. In: *Nat Genet* 10 (2), S. 143–150.
- Sakaguchi, Shimon; Yamaguchi, Tomoyuki; Nomura, Takashi; Ono, Masahiro (2008): Regulatory T cells and immune tolerance. In: *Cell* 133 (5), S. 775–787.
- Sakuishi, Kaori; Jayaraman, Pushpa; Behar, Samuel M.; Anderson, Ana C.; Kuchroo, Vijay K. (2011): Emerging Tim-3 functions in antimicrobial and tumor immunity. In: *Trends in immunology* 32 (8), S. 345–349.
- Salim, Sa'ad Y.; Söderholm, Johan D. (2011): Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. In: *Inflammatory Bowel Diseases* 17 (1), S. 362–381.
- Salzman, Nita H.; Ghosh, Dipankar; Huttner, Kenneth M.; Paterson, Yvonne; Bevins, Charles L. (2003): Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. In: *Nature* 422 (6931), S. 522–526.
- Sanjabi, Shomyseh; Zenewicz, Lauren A.; Kamanaka, Masahito; Flavell, Richard A. (2009): Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. In: *Current opinion in pharmacology* 9 (4), S. 447–453.
- Sarantis, Helen; Gray-Owen, Scott D. (2007): The specific innate immune receptor CEACAM3 triggers neutrophil bactericidal activities via a Syk kinase-dependent pathway. In: *Cellular microbiology* 9 (9), S. 2167–2180.
- Sauter, S. L.; Rutherford, S. M.; Wagener, C.; Shively, J. E.; Hefta, S. A. (1993): Identification of the specific oligosaccharide sites recognized by type 1 fimbriae from *Escherichia coli* on nonspecific cross-reacting antigen, a CD66 cluster granulocyte glycoprotein. In: *The Journal of biological chemistry* 268 (21), S. 15510–15516.
- SCHRODER, U. (1976): Stability of fluorescein labeled dextrans in vivo and in vitro. In: *Microvascular Research* 11 (1), S. 33–39.
- Schulz, Olga; Pabst, Oliver (2013): Antigen sampling in the small intestine. In: *Trends in immunology* 34 (4), S. 155–161.
- Schulzke, J. D.; Gitter, A. H.; Mankertz, J.; Spiegel, S.; Seidler, U.; Amasheh, S. et al. (2005): Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. In: *Biochimica et biophysica acta* 1669 (1), S. 34–42.

- Schumann, D.; Chen, C. J.; Kaplan, B.; Shively, J. E. (2001): Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1 directly associates with cytoskeleton proteins actin and tropomyosin. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (50), S. 47421–47433.
- Scott, C. L.; Bain, C. C.; Wright, P. B.; Sichien, D.; Kotarsky, K.; Persson, E. K. et al. (2015): CCR2(+)CD103(-) intestinal dendritic cells develop from DC-committed precursors and induce interleukin-17 production by T cells. In: *Mucosal immunology* 8 (2), S. 327–339.
- Shi, Jishu; Aono, Shelly; Lu, Wuyuan; Ouellette, Andre J.; Hu, Xueyou; Ji, Yingbiao et al. (2007): A novel role for defensins in intestinal homeostasis. Regulation of IL-1beta secretion. In: *J Immunol* 179 (2), S. 1245–1253.
- Simmons, C. P.; Clare, S.; Ghaem-Maghami, M.; Uren, T. K.; Rankin, J.; Huett, A. et al. (2003): Central Role for B Lymphocytes and CD4+ T Cells in Immunity to Infection by the Attaching and Effacing Pathogen *Citrobacter rodentium*. In: *Infection and immunity* 71 (9), S. 5077–5086.
- Simms, L. A.; Doecke, J. D.; Walsh, M. D.; Huang, N.; Fowler, E. V.; Radford-Smith, G. L. (2008): Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. In: *Gut* 57 (7), S. 903–910.
- Singer, Bernhard B.; Opp, Lena; Heinrich, Annina; Schreiber, Frauke; Binding-Liermann, Ramona; Berrocal-Almanza, Luis Carlos et al. (2014): Soluble CEACAM8 interacts with CEACAM1 inhibiting TLR2-triggered immune responses. In: *PLoS one* 9 (4), e94106.
- Singer, Bernhard B., Scheffrahn, Inka and Öbrink, Björn (2000): The Tumor Growth-inhibiting Cell Adhesion Molecule CEACAM1 (C-CAM) Is Differently Expressed in Proliferating and Quiescent Epithelial Cells and Regulates Cell Proliferation. In: *Cancer research*
- Smythies, Lesley E.; Sellers, Marty; Clements, Ronald H.; Mosteller-Barnum, Meg; Meng, Gang; Benjamin, William H. et al. (2005): Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. In: *The Journal of clinical investigation* 115 (1), S. 66–75.
- Spitz, J.; Yuhan, R.; Koutsouris, A.; Blatt, C.; Alverdy, J.; Hecht, G. (1995): Enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to intestinal epithelial monolayers

diminishes barrier function. In: *The American journal of physiology* 268 (2 Pt 1), G374-9.

Steimle, Alex; Frick, Julia-Stefanie (2016): Molecular Mechanisms of Induction of Tolerant and Tolerogenic Intestinal Dendritic Cells in Mice. In: *Journal of immunology research* 2016, S. 1958650.

Steinman, Ralph M. (2012): Decisions about dendritic cells. Past, present, and future. In: *Annual review of immunology* 30, S. 1–22.

Stern, N.; Markel, G.; Arnon, T. I.; Gruda, R.; Wong, H.; Gray-Owen, S. D.; Mandelboim, O. (2005): Carcinoembryonic Antigen (CEA) Inhibits NK Killing via Interaction with CEA-Related Cell Adhesion Molecule 1. In: *The Journal of Immunology* 174 (11), S. 6692–6701.

Sun, Zhengwu; Wang, Xiangdong; Andersson, Roland (1998): Role of Intestinal Permeability in Monitoring Mucosal Barrier Function. In: *Dig Surg* 15 (5), S. 386–397.

Swidsinski, Alexander; Ladhoff, Axel; Pernthaler, Annelie; Swidsinski, Sonja; Loening-Baucke, Vera; Ortner, Marianne et al. (2002): Mucosal flora in inflammatory bowel disease. In: *Gastroenterology* 122 (1), S. 44–54.

Symonds, E. L.; Riedel, C. U.; O'Mahony, D.; Lapthorne, S.; O'Mahony, L.; Shanahan, F. (2009): Involvement of T helper type 17 and regulatory T cell activity in *Citrobacter rodentium* invasion and inflammatory damage. In: *Clinical and experimental immunology* 157 (1), S. 148–154.

Takeuchi, Osamu; Akira, Shizuo (2010): Pattern recognition receptors and inflammation. In: *Cell* 140 (6), S. 805–820.

Tamboli, C. P. (2004): Dysbiosis in inflammatory bowel disease. In: *Gut* 53 (1), S. 1–4.

Tanaka, Masanori; Saito, Hiroshi; Kusumi, Tomomi; Fukuda, Shinsaku; Shimoyama, Tadashi; Sasaki, Yoshihiro et al. (2001): Spatial distribution and histogenesis of colorectal Paneth cell metaplasia in idiopathic inflammatory bowel disease. In: *J Gastroenterol Hepatol* 16 (12), S. 1353–1359.

Tang, Qizhi; Henriksen, Kammi J.; Bi, Mingying; Finger, Erik B.; Szot, Greg; Ye, Jianqin et al. (2004): In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. In: *J Exp Med* 199 (11), S. 1455–1465.

Taylor, Cormac T.; Dzus, Andrea L.; Colgan, Sean P. (1998): Autocrine regulation of epithelial permeability by hypoxia. Role for polarized release of tumor necrosis factor α . In: *Gastroenterology* 114 (4), S. 657–668.

Taylor, K. B. (1966): Ulcerative colitis. In: *California medicine* 104 (3), S. 191–200.

Teahon, K.; Smethurst, P.; Levi, A. J.; Menzies, I. S.; Bjarnason, I. (1992): Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their first degree relatives. In: *Gut* 33 (3), S. 320–323.

Tepperman, B. L.; Brown, J. F.; Korolkiewicz, R.; Whittle, B. J. (1994): Nitric oxide synthase activity, viability and cyclic GMP levels in rat colonic epithelial cells. Effect of endotoxin challenge. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 271 (3), S. 1477–1482.

Thaventhiran, Thilipan (2013): T Cell Co-inhibitory Receptors-Functions and Signalling Mechanisms. In: *J Clin Cell Immunol* 01 (S12).

Thia, Kelvin T.; Sandborn, William J.; Harmsen, William S.; Zinsmeister, Alan R.; Loftus, Edward V., JR (2010): Risk factors associated with progression to intestinal complications of Crohn's disease in a population-based cohort. In: *Gastroenterology* 139 (4), S. 1147–1155.

Tsukita, S.; Furuse, M.; Itoh, M. (2001): Multifunctional strands in tight junctions. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 2 (4), S. 285–293.

Turner, Jerrold R. (2006): Molecular basis of epithelial barrier regulation. From basic mechanisms to clinical application. In: *The American journal of pathology* 169 (6), S. 1901–1909.

Turner, Jerrold R. (2009): Intestinal mucosal barrier function in health and disease. In: *Nat Rev Immunol* 9 (11), S. 799–809.

Uematsu, Satoshi; Fujimoto, Kosuke; Jang, Myoung Ho; Yang, Bo-Gie; Jung, Yun-Jae; Nishiyama, Mika et al. (2008): Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. In: *Nature immunology* 9 (7), S. 769–776.

Umetsu, Dale T.; McIntire, Jennifer J.; Akbari, Omid; Macaubas, Claudia; DeKruyff, Rosemarie H. (2002): Asthma. An epidemic of dysregulated immunity. In: *Nature immunology* 3 (8), S. 715–720.

Valatas, Vassilis; Bamias, Giorgos; Kolios, George (2015): Experimental colitis models: Insights into the pathogenesis of inflammatory bowel disease and translational issues. In: *European journal of pharmacology* 759, S. 253–264.

van der Sluis, Maria; Koning, Barbara A. E. de; Bruijn, Adrianus C. J. M. de; Velcich, Anna; Meijerink, Jules P. P.; van Goudoever, Johannes B. et al. (2006): Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. In: *Gastroenterology* 131 (1), S. 117–129.

Velcich, Anna; Yang, WanCai; Heyer, Joerg; Fragale, Alessandra; Nicholas, Courtney; Viani, Stephanie et al. (2002): Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. In: *Science* 295 (5560), S. 1726–1729.

Virji, M.; Evans, D.; Griffith, J.; Hill, D.; Serino, L.; Hadfield, A.; Watt, S. M. (2000): Carcinoembryonic antigens are targeted by diverse strains of typable and non-typable *Haemophilus influenzae*. In: *Molecular Microbiology* 36 (4), S. 784–795.

Virji, M.; Evans, D.; Hadfield, A.; Grunert, F.; Teixeira, A. M.; Watt, S. M. (1999): Critical determinants of host receptor targeting by *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. Identification of Opa adhesin topes on the N-domain of CD66 molecules. In: *Molecular Microbiology* 34 (3), S. 538–551.

Wales, A. D.; Pearson, G. R.; Roe, J. M.; Hayes, C. M.; La Ragione, R. M.; Woodward, M. J. (2005): Attaching-effacing lesions associated with *Escherichia coli* O157:H7 and other bacteria in experimentally infected conventional neonatal goats. In: *Journal of comparative pathology* 132 (2-3), S. 185–194.

Walunas, Theresa L.; Lenschow, Deborah J.; Bakker, Christina Y.; Linsley, Peter S.; Freeman, Gordon J.; Green, Jonathan M. et al. (1994): CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. In: *Immunity* 1 (5), S. 405–413.

Wan, H.; Winton, H. L.; Soeller, C.; Tovey, E. R.; Gruenert, D. C.; Thompson, P. J. et al. (1999): Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. In: *The Journal of clinical investigation* 104 (1), S. 123–133.

Wanyin Deng, Jose L. Puente, Samantha Gruenheid, Yuling Li, Bruce A. Vallance, Alejandra Vazquez (2004): Dissecting virulence: Systematic and functional analyses of a pathogenicity island. In: *PNAS*, S. 3597–3602.

Watanabe, Mamoru; Ueno, Yoshitaka; Yajima, Tomoharu; Okamoto, Susumu; Hayashi, Tatsuhiko; Yamazaki, Motomi et al. (1998): Interleukin 7 Transgenic Mice

Develop Chronic Colitis with Decreased Interleukin 7 Protein Accumulation in the Colonic Mucosa. In: *J Exp Med* 187 (3), S. 389–402.

Watt, S. M. (2001): Homophilic adhesion of human CEACAM1 involves N-terminal domain interactions. Structural analysis of the binding site. In: *Blood* 98 (5), S. 1469–1479.

Watt, S. M.; Sala-Newby, G.; Hoang, T.; Gilmore, D. J.; Grunert, F.; Nagel, G. et al. (1991): CD66 identifies a neutrophil-specific epitope within the hematopoietic system that is expressed by members of the carcinoembryonic antigen family of adhesion molecules. In: *Blood* 78 (1), S. 63–74.

Weaver, Casey T.; Harrington, Laurie E.; Mangan, Paul R.; Gavrieli, Maya; Murphy, Kenneth M. (2006): Th17. An effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. In: *Immunity* 24 (6), S. 677–688.

Weber, Benjamin; Saurer, Leslie; Schenk, Mirjam; Dickgreber, Nina; Mueller, Christoph (2011): CX3CR1 defines functionally distinct intestinal mononuclear phagocyte subsets which maintain their respective functions during homeostatic and inflammatory conditions. In: *European journal of immunology* 41 (3), S. 773–779.

Wehkamp, Jan; Fellermann, Klaus; Herrlinger, Klaus R.; Bevins, Charles L.; Stange, Eduard F. (2005a): Mechanisms of disease. Defensins in gastrointestinal diseases. In: *Nature clinical practice. Gastroenterology & hepatology* 2 (9), S. 406–415.

Wehkamp, Jan; Salzman, Nita H.; Porter, Edith; Nuding, Sabine; Weichenthal, Michael; Petras, Robert E. et al. (2005b): Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (50), S. 18129–18134.

Wei, Fang; Zhong, Shi; Ma, Zhengyu; Kong, Hong; Medvec, Andrew; Ahmed, Rafi et al. (2013): Strength of PD-1 signaling differentially affects T-cell effector functions. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (27), E2480-9.

Wherry, E. John; Kurachi, Makoto (2015): Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. In: *Nature reviews. Immunology* 15 (8), S. 486–499.

Wiles, Siouxsie; Clare, Simon; Harker, James; Huett, Alan; Young, Douglas; Dougan, Gordon; Frankel, Gad (2004): Organ specificity, colonization and clearance dynamics

in vivo following oral challenges with the murine pathogen *Citrobacter rodentium*. In: *Cellular microbiology* 6 (10), S. 963–972.

Willerford, Dennis M.; Chen, Jianzhu; Ferry, Judith A.; Davidson, Laurie; Ma, Averil; Alt, Frederick W. (1995): Interleukin-2 receptor α chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. In: *Immunity* 3 (4), S. 521–530.

Workman, C. J.; Cauley, L. S.; Kim, I.-J.; Blackman, M. A.; Woodland, D. L.; Vignali, D. A. A. (2004): Lymphocyte Activation Gene-3 (CD223) Regulates the Size of the Expanding T Cell Population Following Antigen Activation In Vivo. In: *The Journal of Immunology* 172 (9), S. 5450–5455.

Xavier, R. J.; Podolsky, D. K. (2007): Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. In: *Nature* 448 (7152), S. 427–434.

Yang, H.; McElree, C.; Roth, M. P.; Shanahan, F.; Targan, S. R.; Rotter, J. I. (1993): Familial empirical risks for inflammatory bowel disease. Differences between Jews and non-Jews. In: *Gut* 34 (4), S. 517–524.

Yu, Qigui; Chow, Edith M. C.; Wong, Henry; Gu, Jenny; Mandelboim, Ofer; Gray-Owen, Scott D.; Ostrowski, Mario A. (2006): CEACAM1 (CD66a) promotes human monocyte survival via a phosphatidylinositol 3-kinase- and AKT-dependent pathway. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (51), S. 39179–39193.

Zalzali, H.; Naudin, C.; Bastide, P.; Quittau-Prevostel, C.; Yaghi, C.; Poulat, F. et al. (2008): CEACAM1, a SOX9 direct transcriptional target identified in the colon epithelium. In: *Oncogene* 27 (56), S. 7131–7138.

Zebhauser, Roland; Kammerer, Robert; Eisenried, Andreas; McLellan, Andrew; Moore, Tom; Zimmermann, Wolfgang (2005): Identification of a novel group of evolutionarily conserved members within the rapidly diverging murine Cea family. In: *Genomics* 86 (5), S. 566–580.

Zeissig, S.; Bürgel, N.; Günzel, D.; Richter, J.; Mankertz, J.; Wahnschaffe, U. et al. (2007): Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. In: *Gut* 56 (1), S. 61–72.

Zenlea, Talia; Peppercorn, Mark A. (2014): Immunosuppressive therapies for inflammatory bowel disease. In: *World journal of gastroenterology* 20 (12), S. 3146–3152.

Zhang, Xuewu; Schwartz, Jean-Claude D.; Guo, Xiaoling; Bhatia, Sumeena; Cao, Erhu; Lorenz, Michael et al. (2004): Structural and Functional Analysis of the Costimulatory Receptor Programmed Death-1. In: *Immunity* 20 (5), S. 651.

Zhang, Yang; Cai, Pengcheng; Li, Lei; Shi, Liang; Chang, Panpan; Liang, Tao et al. (2017): Co-expression of TIM-3 and CEACAM1 promotes T cell exhaustion in colorectal cancer patients. In: *International immunopharmacology* 43, S. 210–218.

Zhou, Muqing; Jin, Zhiming; Liu, Yiwen; He, Yiqing; Du, Yan; Yang, Cuixia et al. (2017): Up-regulation of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 in gastrointestinal cancer and its clinical relevance. In: *Acta biochimica et biophysica Sinica*, S. 1–7.

Zolotarevsky, Yevgeny; Hecht, Gail; Koutsouris, Athanasia; Gonzalez, Deborah E.; Quan, Cliff; Tom, Jeffrey et al. (2002): A membrane-permeant peptide that inhibits MLC kinase restores barrier function in in vitro models of intestinal disease. In: *Gastroenterology* 123 (1), S. 163–172.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der aufregenden letzten 3 Jahre so tatkräftig unterstützt haben. Vor allem geht mein herzlichster Dank an:

Frau Prof. Dr. A. Westendorf für die herzliche Aufnahme und Möglichkeit der fachlichen Weiterbildung in ihrer Arbeitsgruppe durch die meine Doktorarbeit überhaupt erst ermöglicht wurde. Des Weiteren möchte ich mich für die interessante Themenvergabe bedanken, die mich nachhaltig inspiriert hat.

Herrn Prof. Dr. K. S. Lang für die freundliche Übernahme als Zweitbetreuer und stete Hilfsbereitschaft während der Promotionszeit und die vielen fachlich kompetenten und hilfreichen Diskussionen die mir häufig den Blick über den „Tellerrand“ erleichterten und mich stets motivierten. Nicht zuletzt möchte ich mich bei Ihm und auch Herrn Dr. V. Khairnar für die Breitstellung der Mäuse bedanken.

Gleichermaßen möchte ich mich bei Herrn PD Dr. B. B. Singer als Experte im weiten Feld der CEA-Proteine für seine fachliche Unterstützung und die vielen herzlichen und hilfreichen Diskussionen und Ratschläge bedanken. Bei dieser Gelegenheit bedanke ich mich ebenfalls für die herzliche und kompetente Kooperation mit seiner Doktorandin Verena Schmitt.

Bei Mechthild-Hemmler Roloff möchte ich mich von Herzen für die unzähligen wunderbaren Stunden bedanken, die sie gemeinsam mit mir im Labor verbracht hat. Ohne Sie wären die Experimente nicht möglich gewesen. Auch möchte ich mich für Ihr stets offenes Ohr bedanken.

Ein Dank geht ferner an all die wunderbaren Menschen aus dem Labor Westendorf und Hansen, für die entgegengebrachte Hilfsbereitschaft und Offenherzigkeit sowohl auf fachlicher als auch zwischenmenschlicher Ebene. Die vielen heiteren Gespräche und heiß geliebten Kaffeepausen, haben den Laboralltag mit viel Humor und guter Laune versehen.

Von Herzen bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mich mit einer Engelsgeduld unterstützt, motiviert und aufgefangen haben wenn es schwierig wurde.

9 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

10 Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema Entwicklung von „Die Bedeutung des Zelladhäsionsmoleküls CEACAM1 für den Verlauf einer bakteriell-induzierten Colitis“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Julia Zöller befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den _____

Prof. Dr. A. Westendorf

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) c) + e) der Promotionsordnung Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____

Julia Zöller

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

Julia Zöller